全国高等学校农林规划教材

植物育种学实验

主　　编　陈学森

副 主 编　高荣岐　杨建平　胡延吉　李常保

编写人员　（按姓氏拼音）

陈美霞　陈晓流　陈学森　冯宝春

高荣岐　胡延吉　李常保　李宪彬

刘凤珍　潘　敏　孙丽萍　田纪春

杨建平　尹燕枰

高等教育出版社

内容提要

本书是实施国家教育部“新世纪高等教育教学改革工程”本科教育教学改革立项《植物生产类人才培养方案的研究与实践》的重要内容和成果。

内容包括：绪论、创造变异（植物有性杂交技术与创造变异的新技术）、鉴定变异（植物经济性状、品质性状、抗逆性、染色体倍性及分子生物学鉴定技术）及选择与利用变异（植物育种方案的设计、实施与选择技术、植物良种繁育技术以及植物品种鉴别与种子质量监控技术等），共三篇，9章，69个实验。

本书是为植物科学与技术专业编写的系列教材之一，也可作为农学、园艺、植物遗传育种、种子科学与工程、生物技术及其他相关专业研究生、教师、科研人员的参考书或教材。

图书在版编目（CIP）数据

植物育种学实验 陈学森主编. —北京：高等教育出版社，2004.10

ISBN 7-04-015431-5

Ⅰ.植… Ⅱ.陈… Ⅲ.植物育种—实验—高等学校—教材 Ⅳ.S33-33

中国版本图书馆 CIP数据核字（2004）第 092159号

策划编辑 李光跃 **责任编辑** 张晓晶 **封面设计** 张 楠 **责任绘图** 尹文军
版式设计 范晓红 **责任校对** 王效珍 **责任印制**

出版发行 高等教育出版社
社 址 北京市西城区德外大街4号
邮政编码 100011
总 机 010-58581000

购书热线 010-64054588
免费咨询 800-810-0598
网 址 http://www.hep.edu.cn
http://www.hep.com.cn

经 销 新华书店北京发行所
印 刷

开 本 787×1092 1/16
印 张 15.75
字 数 380 000

版 次 2004年6月 第1版
印 次 2004年6月 第1次印刷
定 价 18.50元

本书如有缺页、倒页、脱页等质量问题，请到所购图书销售部门联系调换。

版权所有 侵权必究

物料号： 15431-00

序

为了加快对传统农业学科的改造，培养适应农业现代化发展需要的高科技农业人才，教育部在“九五”期间设立了“面向21世纪教学内容和课程体系改革”重大研究项目，将《植物生产类（农学专业）人才培养方案的研究》列为研究重点，旨在推动拓宽传统农学专业人才培养口径的理论研究，为发展植物生产类宽口径专业奠定理论基础。“十五”期间，教育部又将《植物生产类人才培养方案的研究与实践》列为“新世纪高等教育教学改革工程”重大教育研究项目。该项目不仅要对整个植物生产类人才培养方案的理论研究进行充实和完善，而且要按照新人才培养方案培养学生。山东农业大学承担了这一重大项目。为了使理论与实践紧密结合，在调查研究、组织国内知名教育专家论证的基础上，经教育部批准在山东农业大学试办了我国第一个植物科学与技术本科专业。

主干专业课程的设置是专业培养口径宽窄的重要体现，是专业建设的基础性工作之一。我国高等农业院校传统的植物生产类专业一般包括农学、园艺和植物保护三个专业，部分学校还包括草业、林学。为了适应农业产业化的需要，我们将“植物生产学”、“植物育种学”和“植物保护学”三门课程列为植物科学与技术专业的主干专业课程。三门课程既相互独立又相互联系，形成该专业的专业课程体系。在教育部高等教育司农林医药处和高等教育出版社的支持和关心下，与上述课程配套的三本教材作为“新世纪高等教育教学改革工程”重大教研项目成果，已于2003年正式出版。

为了强化学生实践技能、动手能力、创新精神和创新素质的培养，山东农业大学植物科学与技术专业建设领导小组组织有关专家对该专业人才培养方案进行了修订，决定将“植物生产学”、“植物育种学”和“植物保护学”三门课程的实验单独设立实验课程，纳入教学计划，增加实验教学的学时和比重。同时提出，要把改革实验内容与实验方法结合起来，减少验证性实验项目，增加综合性实验和设计性实验内容，构建具有专业特色的实践教学体系。2003年底，高等教育出版社生命科学分社的林金安社长、吴雪梅高级策划在来山东农业大学调研专业建设、课程建设和教学改革时，同意我们编写《植物生产学实验》、《植物育种学实验》和《植物保护学实验》的设想。植物科学与技术专业建设领导小组，组织农学、园艺、植保等学科的专业人员，在总结了该专业实验课教学经验的基础上，借鉴相关专业实验内容和方法，进行了认真编写和多次修改。在教育部高等教育司农林医药处和高等教育出版社的支持和关心下，三本实验教材也作为“新世纪高等教育教学改革工程”重大教研项目的配套教材，列入高等教育出版社出版计划。应当说这三本实验教材的构思、编写、出版和应用，只是一个新的尝试，还未经过充分的实践检验，再加上编者水平有限，错误和不足在所难免，恳请关心该专业建设的专家、读者批评指正。

植物科学与技术专业是新专业，教材建设是该专业的基本建设。三门专业课程及其配套的实验教材能及时出版，得到了高等教育出版社的大力支持，在此，表示诚挚的感谢。

植物科学与技术专业建设领导小组

2004年 3月

前　言

《植物育种学实验》是为植物科学与技术等专业编写的系列教材之一。按照宽专业、厚基础、重应用的教育改革方向，在引导学生全面掌握植物育种基本原理和新技术的基础上，着力培养学生的创新意识、动手能力以及分析问题和解决问题的能力，配合《植物育种学》教材，我们组织编写了《植物育种学实验》，作为实施国家教育部“新世纪高等教育教学改革工程”本科教育教学改革立项重大项目《植物生产类人才培养方案的研究与实践》的重要内容之一。本书具有如下突出特色：

1. 系统性

纵观植物育种的全过程，植物育种学即是研究如何创造变异、发现变异、鉴定变异、选择变异及利用变异。《植物育种学实验》作为《植物育种学》的配套教材，兼顾辅助性和独立性，自成体系。全书分上、中、下三篇，上篇为创造变异，中篇为鉴定变异，下篇为选择及利用变异，共9章69个实验。因此，《植物育种学实验》具有较强的系统性与完整性。需要说明的是，中篇是关于植物育种材料的鉴定、评价技术，所鉴定的材料，有些是作为新品系、新品种而用于生产，有些是作为进一步育种的种质材料。因此，中篇也就包含植物种质资源的鉴定与评价。

2. 注重学生创新意识及创新能力的培养

以往的大田作物、果树作物、蔬菜作物、茶叶作物及观赏植物等育种实验指导注重知识传授，一方面，绝大多数实验课的实验内容、操作步骤等编得过细，讲求统一步调，学生按部就班操作，方法步骤相同，实验结果一致，难以充分发挥学生灵活思维的能动性和创造性，造成过分依赖实验指导书的被动局面；另一方面，实验教学内容体系上，演示性、验证性、模拟性实验占绝大多数，而综合性、设计性和研究性实验占的比例很少。为此本实验教材在适当提高综合性、设计性和研究性实验的比例，淘汰一些落后的演示性、验证性和模拟性实验的同时，力求做到精练与详细相结合，知识传授与能力培养相结合。有些实验，例如RAPD分析、SSR分析及植物品质性状鉴定技术等，应尽可能详细介绍，起到工具书的作用，具有实用性和参考性；有些实验，特别是综合性、设计性和研究性实验，如植物抗性鉴定等，力求简明扼要，在阐述基本原理或基本方法的基础上，引导学生主动思维；同一实验，不同的学生可以设计不同的实验方案，采用不同的实验材料，取得不同的实验结果。在提高学生实验操作能力的基础上，重在培养学生的创新能力及综合运用知识，分析问题和解决问题的能力。

3. 突出高、新、合的编写原则

当今科技发展日新月异，特别是学科的相互渗透与交叉，新的边缘学科不断产生，植物育种的手段也不断改进。本教材尽可能介绍创造变异、鉴定变异及选择变异的最新技术和方法，起点

高，内容新；在打破草本与木本、一年生与多年生之界限，实现实质性融合的同时，兼顾不同植物的特点及个性。

本书由山东农业大学农学院及园艺科学与工程学院的教师组成编写小组，在对教材的总体框架、编写思路、章节安排及内容体系等进行认真研讨、规划的基础上，提出了具体的编写要求，并进行了编写任务分工：陈学森负责编写绪论和第五、六章，高荣岐负责编写第四、九章，杨建平负责编写第一、八章，胡延吉负责编写第二、七章，李常保负责编写第三章，另外，田纪春、尹燕枰、李宪彬、陈晓流、陈美霞、刘凤珍、冯宝春、孙丽萍及潘敏等参与了部分实验的编写工作。由陈学森、高荣岐、杨建平、胡延吉及李常保负责全书的修改和统稿。本书是在参考了不同专业的育种学实验指导以及国内外文献资料的基础上，结合编写人员多年的教学和科研经验编写而成，是集体智慧的结晶。

本书的编写得到了山东农业大学领导、教务处、农学院、园艺科学与工程学院的高度重视和支持，组织专家对编写大纲及内容体系进行论证，提出编写原则及要求；对初稿进行多次讨论，提出修改意见。教育部高等教育司农林医药处和高等教育出版社对本书的立项、编写及出版给予了大力支持和精心指导，提出了很好的建设性意见，我们对此表示衷心感谢。

本实验教材是为植物科学与技术专业编写的系列教材之一，也可作为农学、园艺、植物遗传育种、种子科学与工程、生物技术及其他相关专业研究生、教师、科研人员的参考书或教材。本书是我国第一部将大田作物、果树作物、蔬菜作物、茶叶作物及观赏植物融为一书的植物育种学实验教材，覆盖面广，涉及学科多，技术发展快，编写难度较大，虽经编著者共同努力，但由于水平所限，时间又较仓促，书中讹误及不妥之处在所难免，恳切期望使用本教材的师生及读者不吝赐教，提出宝贵意见，以便修订。

编者

2004年 3月

目　录

绪论 …… 1

一、实验教学与大学生的素质培养 …… 1
二、实验教学与理论（课堂）教学的关系 …… 1
三、转变观念，建立植物育种实验教学的软件及硬件新体系 …… 2

上篇　创造变异

第一章　植物有性杂交技术 …… 5

实验 1　自花授粉植物有性杂交技术 …… 5
实验 2　异花授粉植物有性杂交技术 …… 7
实验 3　常异花授粉植物有性杂交技术 …… 9
实验 4　营养繁殖植物有性杂交技术 …… 12
实验 5　植物不育性的观察与鉴定技术 …… 14
实验 6　植物自交不亲和性测定技术 …… 17
实验 7　植物花粉生活力测定技术 …… 19

第二章　创造植物变异的新技术 …… 23

实验 8　植物组织培养技术 …… 23
实验 9　植物原生质体培养技术 …… 27
实验 10　植物辐射诱变技术 …… 31
实验 11　植物化学诱变技术 …… 34
实验 12　植物多倍体诱导与鉴定技术 …… 38
实验 13　根癌农杆菌介导的植物基因转化技术 …… 42
实验 14　植物航天诱变技术 …… 44

中篇　鉴定变异

第三章　植物经济性状鉴定技术 …… 49

实验 15　植物杂种优势测定技术 …… 49
实验 16　植物杂种后代性状遗传分析 …… 51
实验 17　植物配合力测定技术 …… 52
实验 18　植物单株选择技术 …… 54
实验 19　植物丰产性测定技术 …… 57
实验 20　果树丰产性鉴定技术 …… 58
实验 21　棉花纤维品质测定技术 …… 61
实验 22　作物室内考种 …… 66

第四章　植物品质性状鉴定技术 …… 69

实验 23　植物种子物理性状测定 …… 69
实验 24　植物蛋白质含量的测定（半微量凯氏定氮法） …… 74

实验 25 植物氨基酸总量的测定（茚三酮显色法） …… 77
实验 26 植物淀粉含量及组分测定 …… 80
实验 27 植物脂肪含量的测定（索氏提取法） …… 84
实验 28 植物可溶性糖含量的测定 …… 86
实验 29 植物可滴定酸的测定 …… 88
实验 30 植物维生素 C含量的测定 …… 90
实验 31 植物维生素 A的提取和含量测定 …… 92
实验 32 植物维生素 E含量测定 …… 95
实验 33 植物芳香物质的提取分离及测定 …… 96
实验 34 茶叶茶多酚类物质的测定 …… 99

第五章 植物抗性鉴定技术 …… 101

实验 35 植物抗虫性鉴定 …… 101
实验 36 植物真菌病害抗性鉴定 …… 104
实验 37 植物细菌病害抗性鉴定 …… 110
实验 38 植物病毒病害抗性鉴定 …… 112
实验 39 植物抗倒伏性鉴定 …… 115
实验 40 植物抗寒性鉴定 …… 116
实验 41 植物抗旱性鉴定 …… 127
实验 42 植物抗盐性鉴定 …… 130
实验 43 植物抗涝性鉴定 …… 132
实验 44 植物耐热性鉴定 …… 136

第六章 植物倍性及分子生物学鉴定技术 …… 138

实验 45 植物多倍体鉴定技术 …… 138
实验 46 植物基因组 DNA及总 RNA提取技术 …… 141
实验 47 植物 RAPD分析技术 …… 145
实验 48 植物 AFLP分析技术 …… 148
实验 49 植物 SSR分析技术 …… 154

下篇 选择与利用变异

第七章 植物育种方案的设计、实施与选择技术 …… 157

实验 50 植物育种计划的制定 …… 157
实验 51 植物育种试验田的规划与种植 … 159
实验 52 植物育种程序观察 …… 162
实验 53 有性繁殖植物杂种后代选择 …… 166
实验 54 植物芽变选种技术 …… 169
实验 55 无性繁殖植物杂种后代选择 …… 170
实验 56 植物品种比较与区域试验 …… 173

第八章 植物良种繁育技术 …… 178

实验 57 植物杂交种制种技术 …… 178
实验 58 植物雄性不育系制种技术 …… 181
实验 59 植物化学杀雄制种技术 …… 184
实验 60 植物自交不亲和系制种技术 …… 185
实验 61 无性繁殖植物良种繁育技术 …… 189
实验 62 植物原种生产技术 …… 192

第九章 植物品种鉴别与种子质量监控技术 …… 196

实验 63 植物种和品种的鉴别 …… 196
实验 64 植物品种田间纯度检验 …… 210
实验 65 种子净度和其他植物种子数目的测定 …… 213
实验 66 植物种子含水量测定 …… 216
实验 67 植物种子发芽试验 …… 220
实验 68 植物种子生活力测定 …… 225
实验 69 植物种子室内纯度检验 …… 227

参考文献 …… 238

绪　论

一、实验教学与大学生的素质培养

针对我国高等学校在人才培养上存在的问题，1999年 6月 13日发布的《中共中央、国务院关于深化教育改革，全面推进素质教育的决定》中明确提出要全面贯彻党的教育方针，以提高国民素质为根本宗旨，以培养学生的创新精神和实践能力为重点，造就“有理想、有道德、有文化、有纪律”的德智体美等全面发展的社会主义事业建设者和接班人。同时又指出：高等教育要重视培养大学生的创新能力、实践能力和创业精神，普遍提高大学生的人文素养和科学素养。上述原则指明了高等教育人才培养的方向。实验室是培养面向 21世纪高科技人才的重要基地，是实施素质教育，将人才、知识、科技资源引导到经济建设主战场上去的重要场所。实验教学是实现创新人才培养目标的重要教学环节，它对培养学生的创新意识、动手能力、分析问题和解决问题的能力有着不可替代的作用。学生在实验室环境里，可以感受、理解知识的产生和发展的过程，实现知识由感性到理性的转变，养成科学精神和创新思维的良好习惯。

二、实验教学与理论（课堂）教学的关系

高等学校教学主要分为理论教学和实验教学两部分。理论教学又称为课堂教学，以教材（包括教科书和电子教材等）为媒体，教师课堂讲授为主要形式，学生通过听课、思考、讨论、练习来接受理论知识。理论教学传授给学生系统的科学文化知识，培养学生科学的形象思维和抽象思维能力，是学生获得基础知识和基本理论的主要来源。有许多知识，只有通过教师系统的讲授，学生才容易理解，才能达到对知识深刻理解和牢固掌握。因此，理论教学在高校教学中占有极其重要的地位。而实验教学是以实验室、实验站等为主要场所，在教师指导下，以学生操作仪器，观察现象，记录数据等为主要教学形式。通过实验能丰富、活跃学生的科学思想，加深对课堂所学知识的理解，培养学生对客观世界的观察、分析能力和实事求是、严肃认真的科学态度以及刻苦钻研、坚忍不拔的工作作风。

理论教学是实验教学的前提，动手能力是建立在明确的概念与理论知识基础之上的，若缺乏理论的支持，学生的实践活动必然变得盲目，无法分析、解决实验中出现的问题。实验是理论的来源，实验先于理论，成功的新实验往往是新兴学科的生长点，为科技的发展开辟新的研究领域。脱离实验学理论，学生将难以理解理论知识的内涵。大量的事实证明，在实验中应用过的理论知识，学生理解得比较透彻，记得比较牢固，也能在需要时予以灵活应用。

理论教学与实验教学不是主从关系，而是辩证统一的关系，是两个相互独立、相互依存、相互促进和相互发展的教学体系。理论教学固然重要，而实验教学相对理论教学更具有直观性、时间性、综合性与创新性，实验教学是实现素质教育和创新人才培养目标的重要教学环节，培养学生的创新意识、创新能力，造就创新人才，只有在实验室、试验基地动手、动脑才可能实现。过去我

们对合格人才的理解在认识上有所偏差，片面地强调理论课程教育的重要性，把理论课程教育的好坏当成是培养合格人才的主要标准，只注重抓好理论教学的质量，而对实验教学的作用重视不够，造成理论教学与社会实际脱节，学生动手能力和创新意识不强，许多学生毕业后很难适应社会需求。

三、转变观念，建立植物育种实验教学的软件及硬件新体系

课程改革是教学改革的关键，实验、实践教学的改革是课程改革的难点，在所有课程中，尤以专业课实验教学亟须改革。在淡化专业，专业课理论教学时数大幅度减少的今天，如何通过专业课实验、实践教学的改革来提高专业课的教学质量已成为高校专业课教师关注的热点之一。

注重实验教学观念的更新是深化实验教学改革，提高实验教学质量的先决条件。大学生综合素质教育就是要改变偏重知识传授，轻视能力培养的现行教育模式。因此，实验教学改革的基本目标就是要促使课堂理论教学为重，实验教学为辅向课堂理论教学与实验教学并重转变。植物育种学实验是植物科学与技术专业骨干课程之一，转变观念，建立植物育种实验教学的软件及硬件新体系是实现这一转变，全面提高实验教学质量的根本保证。

（一）建立全新的植物实验教学的软件体系

1. 要有明确的指导思想

全新的植物育种实验教学体系必须建立在教育思想、教育观念转变的基础上。事实上，在植物科学研究中，几乎所有的新发现都要依靠实验研究，从这个意义上讲，植物科学是一种实验性的科学。对人才培养来讲，必须充分重视实验教学工作。因为实验是学生认识生物世界的基础，是知识创新的源头，任何科学创意都来源于科学实验。传统的对实验教学的认识，认为它只是教学的一个环节，是理论知识的验证和理论学习的补充。全新的植物育种实验教学体系必须建立在两个全新的认识上，一是实验教学与理论教学既是两个独立的环节，又是相互密切联系的整体，要树立实践第一的思想，实践检验理论，把创新人才的培养放在实践第一的基础上；二是教学实验的安排要以学生为主体，以有利于全面调动学生的学习积极性，启发学生的创新思维和意识，培养创新进取的科学精神为宗旨安排教学实验的形式与内容。

2. 提高实验教学人员素质

实验室不仅是学生接触实践、认识世界的场所，更应成为科学研究、新技术推广的基地，因此，实验技术人员担负着传授知识和培养能力的双重任务，其作用在于调动学生的主观能动性，启迪学生的思维。其个人素质、道德水平、敬业精神、治学态度及文明举止等对学生影响很大，高素质的实验教学人员对学生的素质提高起到引导、示范和保证作用。因此，要提高实验教学质量，适应高素质人才培养，必须有一支素质高，能力强，有一定钻研精神的实验教学教师和实验技术人员队伍作保证。

3. 调整植物育种实验教学内容体系

诺贝尔奖金获得者杨振宁教授从东、西方文化传统的区别出发，比较了中、美的教学方法后指出：中国传统教学方法重演绎、推理，按部就班，学生严谨认真，基础扎实，但缺少创新意识；而美国的教学方法重归纳、分析和渗透、综合，是一种“体会式”的学习方法，其效果是学生独立思考能力和创造能力强，易于较快地进入科学发展前沿，但根基不够扎实。那么我们的教育就要使中、西方的两种教育思想和方法相互取长补短，创造出有利于培养高质量创新人才的教育体系与

教学方法。

高等教育教学过程中的一个基本矛盾就是学习与发现的矛盾，大学教育从以传习已知为主过渡到以发现未知为主。高等学校的根本任务是培养基础扎实，知识面宽，具有创新能力的高质量人才，而“培养质量”和“人才价值”的关键在于创新。要实现这一培养目标，实验教学内容的更新是关键。因此，本植物育种学实验教材，适当提高了综合性、设计性和研究性实验的比例，同时淘汰了一些落后的演示性、验证性和模拟性实验。在教学计划中，独立设置课程，这样有利于实验教学的改革，保证实验教学的质量。

4. 改进实验教学方法

传统的实验教学不仅告诉学生实验项目，还有详细的实验原理、使用仪器、测试方法、实验步骤乃至数据记录表格等等，实际上是告诉了学生进行实验的全过程，学生只需要按指定的过程一步一步去操作，而用不着再去查资料、思考和创新。这种“抱着走”的教学模式使得教师不曾讲过的东西学生就不会；该注意的地方教师不指出来，学生自己就不会考虑到，就有可能出错。其实，实践性教学的主要目的是为学生提供一种条件，让他们在正确的指导下通过自身的实践努力来提高能力，提高素质。因此，改革这种“抱着走”的实验教学模式，势在必行。下面推荐几种教学方法，可在植物育种实验的教学实践中选择应用。

① 自主式教学法

自主式教学法，就是实验的全过程要求由学生独立完成的教学方法，包括确定实验目的，制定实验方案，安排实验步骤以及设备的调试和实验报告的编写等。这样有利于学生动手、动脑及创造性的发挥。首先应有一本好的实验指导书。如实验指导书应重点介绍实验的原因及实验仪器、设备的构造及使用方法、注意事项，提供实验仪器的原始资料、参数范围等指标，提出实验的要求及实验应达到的目标。具体实验方案的确定，如何达到实验要求及怎样达到实验目标则留给学生自己思考，让学生自己设计实验方案，亲自参与整个实验过程。

② 导学式教学法

所谓导学式教学法，就是通过启发诱导，激发学生主动积极去学习的方式。在实验课的教学中如果教师偏重于讲授，从原理到方法，乃至实验步骤讲得一清二楚，过于详细，就会使学生只是被动地接受，不利于激发学生的学习兴趣。教师应以略讲为主并重点介绍实验仪器及使用方法等。教师要引导学生动脑筋，在实验中观察，发现问题，解决问题。辅导实验过程中对学生提出的问题尽量不直接回答，应多以启发诱导方式，促使学生自己想出答案。

③ 有效地利用多媒体教学

随着计算机多媒体技术的普及，CAI课件已广泛应用于课堂理论的教学中。在实验教学中，多媒体教学可形象地充实实验教学中的不足，特别是可缓解植物育种实验教学的时间、空间矛盾。植物育种学是一门实践性很强的专业课程，但田间实践需要耗费大量的人力、物力、资金和场地，需要专门准备教学试验地，有时仅仅为了一两个教学环节，要提前几个月播种，还需专人管理。例如小麦的杂交技术实验，小麦的生育期在 250天以上，需要提前 7个月播种，来年 5月才能开花。而一个品种的开花期仅仅几天时间，教学计划、节假日休息等都要服从生物时钟的安排，一旦遇到连阴雨天气，错过季节，就不能补救。例如，玉米、棉花的花期正是学生的暑假期间，教学实践的时间安排更加困难，而利用多媒体技术，把作物的杂交技术搬进教室，采用生动形象的动画、声音和图像，模拟现实，可以多次重复，不受场地和气候条件的限制，为学生掌握实际操

作技能，起到重要作用。

④ 置换角色法

置换角色法，就是在实验课中，由学生通过阅读有关文献资料，写出预习报告，确定实验方案，并由学生来讲授的方式。此方法尤其适合综合性、设计性、创新性实验。由于每个学生考虑问题的角度都有所不同，因而设计的实验方案就会有所不同，通过学生自己进行方案设计，从中选有所创新、比较典型的方案由学生自己来讲，既锻炼了学生，又使学生真正参与到实验课当中，使学生真正成为主体。同时又使学生具有一种成就感，就更增加了学生爱上实验课的热情，从而就更加激发了学生的创新思维，形成一种良性循环。

5. 建立考评学生专业技能与素质的量化考核体系

专业课程的学习成绩与教学效果难以评定是一个多年未决的问题。与其他课程一样，以往的作物育种学、果树育种学、蔬菜育种学及园艺育种学等课程的实验教学的考核评分也一直存在很大的随意性，没有一套完整、规范的考核评分体系，不能反映学生掌握理论知识的程度与分析问题、解决问题的能力及授课教学效果，难以有效调动学生的学习积极性。为此，植物育种实验课的考核，应根据实验教学的内容及性质而采用不同的考核办法，即一般性的室内实验可尝试根据参加实验课的次数及实验报告来评定成绩，研究性实验可根据撰写实验方案和现场操作来评分，田间的调查与参观则根据调查报告评分。

（二）优化实验教学环境，建立植物育种实验教学的硬件体系

为了创造有利于学生创新能力发展的教学环境和条件，应加强实验条件、实验环境、实验设施的建设，优化实验教学环境，加大资金投入，建立包括实验室、资源圃及育种圃等在内的植物育种实验教学硬件体系。进而提高实验教学质量，拓宽学生获取知识的渠道，促进学生个性发展。

1. 实验室

根据实验内容，植物育种实验室分为常规实验室和特色实验室。常规实验室主要用于验证理论教学及基本操作技能训练等。实验室内除了备全实验教学所需的仪器设备外，还应制作教学标本及教学录像片等直观教具。特色实验室主要用于特色技能和创新技能培养，主要包括植物组织培养室、品质分析实验室、分子育种实验室、染色体工程实验室及种子科学实验室等特色实验室。

2. 资源圃

搜集主要栽培植物的种、亚种（变种）及品种类型建立种质资源圃，一方面为植物品种的识别与鉴别等实验提供试材，另一方面也为有性杂交试验提供试验场所和杂交亲本。

3. 育种圃

育种圃是植物育种材料（杂交材料、诱变材料、细胞融合材料及转基因材料等）种植鉴定与选择的场所，同时也是研究性实验的教学基地。高教理论研究表明，学生本科后期正处于从有指导的自学向独立的创造性学习的过渡阶段，而开展研究性实验，参加科学研究和技术开发，使教学内容与科研相结合，可以使学生接受到更为实际的科学研究的训练，从而提高其科研、生产实践能力，它符合大学生的心智发展水平与高等教育规律。

上篇　创造变异

第一章　植物有性杂交技术

实验 1　自花授粉植物有性杂交技术

自花授粉有两种含义，对于有性繁殖植物，是指雌蕊接受同一花朵的花粉；对于营养繁殖的果树等作物，是指同一品种（基因型）内的相互授粉。在自然条件下，以自花授粉为主的植物称为自花授粉植物，又称自交植物。自花授粉植物必然是兼有雄蕊和雌蕊的完全花；而且雄雌蕊基本上同时成熟；不存在自交不亲和等特点；在花器结构上具有某些特点使自花授粉在整个传粉过程中占主导地位，其自然异交率一般在 5% 以下，大体上可以分为花粉隔离型和花药包围型。

1. 花粉隔离型

有些是整个花冠形成一个隔离空间，使外部花粉不能接触花柱，如小麦、燕麦、冰草等；有些是部分花冠，如豌豆、豇豆等豆类蔬菜由两片龙骨瓣合生形成一个隔离空间，不仅使外部花粉难以进入，而且可以使花粉受到保护，不易被昆虫吞食和被雨水淋湿。

2. 花药包围型

指花柱受到裂药雄蕊群的包围，如番茄等的花柱由若干枚雄蕊合生的花药筒紧紧地围裹在中间，在授粉受精前难以接触外来花粉。

自花授粉植物群体由许多遗传组成纯合的个体组成，即使个别植株或个别花朵偶然发生天然杂交，也会因连续几代的自花授粉，而使其后代的遗传组成很快趋于纯合。而且自花授粉植物具有自交不退化或退化缓慢的特点，自花授粉方式是在长期的自然选择作用下产生和保留下来的，具有对物种的生存和繁衍有利的特性。

不同科、属的自花授粉植物的有性杂交技术也是不尽相同的，但是，目前在育种上人工去雄杂交还是一个重要手段。为了提高杂交的结实率，应注意掌握和改进杂交技术，本实验以番茄的杂交技术为例来说明自花授粉植物的有性杂交技术。

一、试材及用具

1. 试材

供杂交用的亲本材料为番茄，同时也可根据实验安排，准备小麦、葡萄、大豆、芸豆及豇豆等。

2. 用具

镊子、授粉器、放大镜、指形管（或小玻璃瓶）、干燥器、培养皿、剪刀、75% 酒精棉球、纸袋、纸

牌及铅笔等。

二、方法步骤

（一）选择亲本并套袋

1. 株选

作杂交亲本的种株，无论是父本还是母本，都应具有该品种的典型性，生长健壮，无病虫危害，选好后进行统一编号并套袋，以防昆虫等传递非目的性花粉。

2. 蕾选（小麦是穗选）

番茄品种多样，有无限生长型与有限生长型之分，而无限生长型在整枝上多留单杆，有限生长型则留 2～4杆。这样选择的花序也有所不同：有限生长型最好选 2～3穗上的花蕾，每花序选留 2～3个；而无限生长型，则选 2～4穗上的花蕾，每穗留 2～4个花蕾，其余的及已开放的，全部去除。

（二）人工去雄

番茄是雌雄同花，其正常的花药通常联合成筒状，其花药的开裂方式是由花药先端向内纵裂，散出的花粉触及柱头而自交授粉，因此杂交去雄必须于蕾期进行。去雄时的花蕾应选择：花冠微露，色泽为绿中泛黄（小麦是在发育时期以全穗抽出，穗基部距旗叶叶耳 1.6 cm左右，穗中部花药呈绿带微黄为宜。选好穗，然后要整穗：用剪刀将穗两端发育较差的小穗剪掉，只留中部10～12个小穗，每一个小穗只保留基部两朵小花。葡萄、豆类多为闭花自交，被认为是最严格的自花授粉植物，要选择花冠由绿转淡绿，第二天要开放的花蕾为好）。去雄的最佳方法是：先用左手的大拇指和食指夹住花柄基部，然后用右手持镊子伸到花药筒的基部，夹住后轻轻上提，技术熟练时，可一次将花药筒全部取出。注意一定要把花药去除干净，并且不要损伤柱头。操作完成后，挂上纸牌，填好品种名称、株号、去雄日期及操作人等，然后套上纸袋。

（三）花粉采集与贮备

通常于晴天早晨露干后，在选定的父本植物上选取当天盛开的花，用镊子将花药筒取出，放入干燥器内干燥，2～4 h后，将花药取出放在培养皿中，压碎后将花粉过筛装入指形管（或小玻璃瓶）中备用。一般花粉在干燥、冷凉、黑暗的条件下保存寿命较长。用电动采粉器取粉时，一定要在天气晴朗时进行，以防因花器潮湿不利取粉。如果父本的花期晚，则需要进行催花，即将花枝采回室内插瓶，使其在温暖的条件下提前开花，然后取其花粉备用。

（四）授粉

通常在去雄的 1～3 d内，选择晴朗无风、早晨露干时进行授粉结实率最高。授粉时，动作要轻，用授粉器黏取少量花粉轻擦柱头即可。如果一株上有几个花序留蕾杂交时，可按从下而上的自然位置循序授粉，以防遗漏，为提高结实率，也可重复授粉一次，可由上而下进行。操作完毕，在挂好的标牌上，填好父本名称及授粉次数、具体时间等，然后套好纸袋。在授粉后的 8～10 d检查结实情况，并按下表填写有关事项。

注意：所有杂交工作一定注意操作用具的消毒及杀死遗留花粉，即每换一个杂交组合，均要消毒一次，避免混交。

（五）授粉后的管理

杂交后的最初几天要检查纸袋，如脱落、破碎则可能发生了意外的杂交，这些杂交花就无效

了，应重新补做杂交。一周左右，花瓣开始凋谢，幼果渐渐长大时，就可以除去纸袋，以便幼果得到充分发育，同时要防止风、鸟以及病虫的危害。果实达到生理成熟后及时采收，检查结实率。

三、作业思考题

1. 交回得到的目的性杂交果实。并将所得结果填于表 1－1，以实习小组为单位汇总结果，并分析成功或失败的经验或教训，提出你的改进意见和建议。

表 1－1

杂交组合	去雄日期	去雄花数	授粉日期	授粉花数	结实数	结实率	备注

2. 在自花授粉植物的杂交过程中应该注意的问题有哪些？为什么？

（杨建平）

实验 2　异花授粉植物有性杂交技术

异花授粉也有两种含义，对于有性繁殖植物，是指在自然状态条件下雌蕊通过接受其他花朵的花粉受精繁殖后代；对于营养繁殖的果树等作物，是指不同品种（基因型）间的相互授粉。在自然条件下，以异花授粉为主的植物称为异花授粉植物，又称异交植物。异花授粉植物的群体是来源不同、遗传性不同的两性细胞结合而产生异质结合子所繁衍的后代。自花授粉植物和常异花授粉植物限于雌雄同花类型，而且限于被子植物少数几个科、属的草本植物。异花授粉则普遍发生于高等植物所有的科。多数异花授粉植物不耐自交，自交会导致生活力显著衰退。但是雌雄异株和雌雄异花同株类型主要靠性别分化保证其异花授粉，未发现有特殊的自交不亲和机制。

异花授粉植物在花器结构方面有着复杂的多样性，以多种方式适应异花授粉的需要。如开放传粉，雌雄蕊异熟有利于异花授粉；风媒花产生大量小、轻而易于飞扬的花粉，雌蕊具有外露表面大而便于捕捉飘浮花粉的柱头；虫媒花具有对昆虫等传粉动物吸引力很强的艳丽色泽、浓郁而特异的气味、发达的花冠和蜜腺；自交不亲和机制以及上述两个或更多特性的联合机制等。

因不同科、属的异花授粉植物具有不同的花器结构，所以在进行去雄授粉之前必须了解这些不同之处。十字花科蔬菜是目前品种最多，栽培面积最为广泛的蔬菜，并为典型的异花授粉植物，因此本实验以甘蓝为主来说明异花授粉植物的有性杂交技术。

甘蓝开花习性：花序为总状，主茎先抽薹，然后抽出一次枝，一次枝上又抽出二次枝……花的开花次序是先主茎，后一次侧枝、二次侧枝……整株的花是由上而下开放，而每一花序的花则是由下而上开放。早期开放的花会因温度低，授粉不良而结实率低，高次分枝（二次以后的各分枝）顶端的一部分花因营养不良而结实率低，且结的种子也不饱满，这些部位的花蕾均不宜选作杂交用。

实验目的是通过实验操作，掌握苹果、梨等果树植物、十字花科蔬菜、葫芦科蔬菜、百合科蔬

菜、菠菜及玉米等异花授粉植物的有性杂交技术，了解异花授粉植物不同的花器结构和开花动态，根据结果探讨不同杂交组合的结实情况，获得目的性杂交种子以丰富育种的原始材料。

一、试材及用具

1. 试材

供杂交用的亲本材料。可根据实验要求准备试材，如苹果、梨、玉米、大白菜、甘蓝、黄瓜、西瓜、韭菜、大葱及菠菜等。

2. 用具

镊子、授粉器、放大镜、指形管（或小玻璃瓶）、干燥器、培养皿、花粉筛、剪刀、75%酒精棉球、纸袋、纸牌及铅笔等。

二、方法步骤

（一）亲本的株选

由于十字花科蔬菜为异花授粉植物，品种内株间的差异较大，所以在选择亲本时一定要选择具有本品种典型性，生长健壮，无病虫害的植株，选定后要统一编号，父、母本要套袋隔离。

（二）花序选择及整枝疏花

一般自然生长的种株分枝较多，作杂交亲本时，为保证营养和种子的饱满，要适当整理植株，去除过多无效的高次分枝，杂交用花序选主茎和一次侧枝上的为佳。每花序留 15个左右的饱满花蕾，去除已经开放或多余的幼小花蕾。

（三）去雄套袋

选开花前 1～2 d的花蕾，此时的花冠微露出淡绿色花瓣，但尚未开放（阶段划分称为黄蕾期），用镊子轻轻挑开花萼和花冠，再用镊子把全部雄蕊（四强两弱）除净。如果杂交组合为正反交，可将去雄时取下的花药置于指形管（或小玻璃瓶）中保存。操作时不要损坏柱头，尽量减少对花冠的破坏，以使柱头仍处在一个适宜的环境之中。十字花科蔬菜的去雄时间一般应在6∶00— 8∶00和 16∶00— 18∶00，因为这时温度低，花器失水少，也有利于伤口的愈合。操作完毕后，要套纸袋，以防昆虫等传粉。

苹果、梨、桃、杏及李等果树植物，可采用连被去雄法，即用去雄器或手指甲将部分萼筒、雄蕊及花瓣一次去掉，授粉后不用套袋，显著地提高了杂交效率，可在有限的授粉时间内，获得尽可能多的杂交种子。

（四）花粉采集与贮备

去除父本的套袋，选当天盛开的花朵，取回室内，将花药取下，集中于培养皿中，放入干燥器中干燥 2～4 h，再取出用花粉筛分离，将筛出的花粉盛入指形管（或小玻璃瓶）中备用。一般花粉在干燥、冷凉、黑暗的条件下保存寿命较长。如果父本的花期晚，则需进行催花，对果树植物如苹果、梨等可以将花枝采回室内插瓶（称为切枝水培），使其在温暖的条件下提前开花，然后按照上述方法取其花粉备用。

（五）授粉

去除母本纸袋，去雄 1～2 d后的花（即当天盛开的花）用授粉器黏取少量父本花粉轻擦其柱头即可，为保证结实率，可重复授粉。授粉的时间在 8∶00— 11∶00和 15∶00— 17∶00为佳。操作

完毕后，挂上纸牌，注明父、母本名称、株号、去雄日期、授粉日期、授粉次数及授粉（去雄）人等字样，套上纸袋。

（六）授粉后的管理

杂交后的最初几天要检查纸袋，如脱落、破碎则可能发生了意外的杂交，这些杂交花就无效了，应重新补做杂交。一周左右，花瓣开始凋谢，幼果渐渐长大时，就可以除去纸袋，以便幼果充分发育，同时要防止风、鸟以及病虫的危害。果实达到生理成熟后及时采收，检查结实率。

注意事项：

1. 如果不同的杂交组合是在不同的隔离区内进行的，则应该分别穿用专用的工作服，以防止人为传粉。

2. 杂交工具在每做完一个杂交组合后要用 75%酒精棉球消毒，杀死残留花粉。

三、作业思考题

1. 交回得到的目的性杂交种子或果实。并将所得结果填于表 1－2，以实验小组为单位汇总结果，并分析成功或失败的经验或教训，提出你的改进意见和建议。

表 1－2

杂交组合	去雄日期	去雄花数	授粉日期	授粉花数	结实数	结实率	备注

2. 异花授粉植物的杂交过程中应该注意的问题有哪些？为什么？

3. 异花授粉植物的自然异交率一般在 50%以上，主要是什么原因引起的？

（杨建平）

实验 3　常异花授粉植物有性杂交技术

常异花授粉植物以自花授粉占优势，是指那些有自花授粉习性，但是花器结构不太严密，从而发生部分异花授粉的植物，通常以自然异交率 5%以上作为常异花授粉植物的下限，范围在 5% ～50%，因此和自花授粉植物一样，连续自交后代的生活力衰退不明显。本实验以棉花为例来说明常异花授粉植物的有性杂交技术。

首先了解一下棉花的花器结构（蚕豆的花器结构与大豆相似，辣椒的花器结构与番茄相似）：棉花的花为单生两性花，每朵花由苞叶（3片）、花萼（5片）、花冠（5片花瓣）、雄蕊和雌蕊 5个部分组成。

1. 苞叶

在花的外层有 3片苞叶，呈三角形。苞叶上部有锯齿形缺刻，基部有联合的（如中棉），也有分离的（如陆地棉）。陆地棉苞叶基部外侧有 3个蜜腺。苞叶有保护作用，并能制造养分，供棉铃发育需要，所以杂交时尽量不要伤害它。

2. 花萼

由 5个联合的萼片组成波浪形的一圈，围着花冠，合成花萼。花萼在苞叶里面，所以色较浅。在萼片基部两片苞叶交接处，通常有蜜腺，所以萼片上一般也有 3个蜜腺。

3. 花冠

由 5个花瓣组成，花瓣为倒三角形，其颜色和大小因棉种而异。海岛棉最大，陆地棉次之，亚洲棉和非洲棉最小。陆地棉的花为乳白色，海岛棉为鲜黄色，亚洲棉为白色、黄色或乳白色。

4. 雄蕊

由花药和花丝组成，花丝基部联合成管状，称雄蕊管。雄蕊管与花基部连接，像管子一样套在雌蕊的花柱外面。雄蕊有 60～90个或更多肾形花药，花药在开花前后或开花的同时开裂，内有花粉粒 100～200粒，花粉粒呈圆球形，黄色或白色，表面有许多突起。

5. 雌蕊

位于花的中央，为雄蕊管所包围，由柱头、花柱和子房 3部分组成。子房卵圆形，是棉花的果实——棉铃的雏形。子房一般 3～5室或更多，每室有 7～11个胚珠，受精后发育成种子。一般每室顶尖只着生一个胚珠，其余则成对排列，所以各室的胚珠数通常都成单数。子房上部有柱头和花柱。花柱较细，上有油腺，柱头突起的表面呈茸毛状，这是一层单细胞的毛，能黏着花粉。棉花柱头不分泌黏液，为干柱头。

其次了解一下棉花的开花习性：棉花的花蕾包裹在苞叶内，在自然情况下，棉花现蕾后 25 d左右即开花。开花前 4～5 d，花冠伸长得很快，在开花前一天上午，花冠急剧伸长，顶部露出苞叶之外，同时花冠变为乳黄色。可利用这一指标作为去雄时间的标志。棉花开花顺序就整个植株讲是由下而上，由内向外，开花的纵向间隔一般 2～4 d，横向间隔 5～8 d。在植株上部和果枝的外围果节，开花间隔天数较多，这主要是因为后期温度降低的缘故。

一般棉株全天都能开花，但以 8∶00—10∶00开花最多，花粉生活力以 10∶00—14∶00最强。当日 15∶00—16∶00以后，花冠渐渐萎缩，开始由乳白色或乳黄色变为微红色，第二天变为红色，第三天变为紫红色，而后渐渐凋谢脱落。开花后花粉生活力一般只能保持数小时，柱头的生活力也只能保持一天左右，所以，开花当天上午进行杂交授粉最好。

棉花开花的同时（或稍有迟早），雄、雌蕊器官已经成熟，9∶00—10∶00花瓣展开，同时花药开裂，花丝伸长，散出花粉。落到柱头上的花粉，经过 1 h左右即开始萌发长出花粉管，伸入柱头，通过花柱，经 8 h左右到达子房，后经珠孔进入胚珠。整个受精过程的完成，约在开花后 20～24 h左右。

实验目的是通过实验操作，掌握茄子、辣椒等蔬菜作物，以及棉花等常异花授粉植物的有性杂交技术，了解常异花授粉植物的花器结构和开花动态，根据结果探讨不同杂交组合的结实情况，获得目的性杂交种子以丰富育种的原始材料。

一、试材及用具

1. 试材

供杂交用的亲本材料可按任课教师要求准备，如棉花、茄子、蚕豆及辣椒等。

2. 用具

镊子、授粉器、放大镜、指形管（或小玻璃瓶）、干燥器、培养皿、花粉筛、剪刀、75%酒精棉球、

纸袋、纸牌及铅笔等。

二、方法步骤

（一）选择杂交亲本

杂交之前，根据已经确定的杂交组合，选择该品种典型的，生长健壮，发育正常的优良单株加以标记作为杂交亲本，套袋并编号。

（二）母本去雄

在开花前一天 16∶00—18∶00，从植株下端数起，选第 5～10果枝、靠近主茎的第 1～2节位并且第 2天将要开花的花朵（花冠乳黄或乳白色，顶端已露出苞叶）进行去雄，常用的方法如下：

1. 手术去雄

用剪刀将花剪去 1/3，或纵向剪裂，用镊子将全部花药取出来，为了防止有残留花粉，最好用洗瓶喷清水，冲洗干净，然后套袋隔离。

2. 徒手去雄

用手拨开苞叶，自花冠基部用拇指和食指将花冠和雄蕊管一起全部剥除，露出雌蕊，注意不要触到柱头和子房，不要用指甲碰破花药，如果不小心碰破花药，应立即用酒精擦拭手指，以杀死花粉，然后套上纸袋，纸袋要高出柱头 1 cm左右，以防损伤柱头。

去雄完毕后，在去雄花朵的花柄上，挂上纸牌，写明母本名称、去雄日期以及去雄人等。

（三）父本隔离

在母本去雄的同时，将父本株第 2天将要开放的花朵花冠顶部用 12 cm长的白线扎起来，或套袋隔离，以保持父本花粉的纯性。

（四）授粉

母本去雄后次日 9∶00—11∶00进行授粉最好，此时花粉与柱头的生活力均较强。

授粉的方法是：

1. 将已经进行隔离的父本花摘下，将花冠剥开，露出花药，同时取下母本所套的纸袋，然后将父本的花粉轻轻授予母本柱头（即将父本的花粉轻轻涂到母本的柱头上）。

2. 为了节省花粉，也可先用镊子将花药取下，放在玻璃器皿内，再用毛笔蘸取花粉轻轻授在母本柱头上，此法比较安全，省花粉，不影响产量，但是较慢。

授粉完毕后，再套上纸袋，并在纸牌上加注父本名称和授粉日期，然后在笔记本上做相关记录。

（五）管理及收获

有杂交铃的果枝，最好打心，少留花铃，以减少杂交铃的脱落，并在授粉后的 7～10 d打开套袋检查一下结实情况。收获时按照杂交组合分别存放，以便统计分析。

三、作业思考题

1. 通过上述实验简述常异花授粉植物有性杂交技术和自花授粉植物、异花授粉植物的有性杂交技术的不同之处，并解释原因。

2. 据上述实验中介绍的方法步骤进行杂交后，按照收获情况，填写表 1—3，并分析一下得到此结果的原因，并提出一定的建议和意见。

表 1—3

去雄方法	徒手去雄	手术去雄	备　　注
杂交组合			
去雄日期			
去雄花数			
授粉日期			
授粉花数			
结铃数			
杂交成功率			

3. 常异花授粉植物有性杂交过程中，所要注意的事项有哪些？为什么？

（潘敏）

实验 4　营养繁殖植物有性杂交技术

无性繁殖是指不经过两性细胞受精过程而繁殖后代的方式。无性繁殖可分为两大类：营养体繁殖和无融合生殖。

营养体繁殖是指利用植物营养器官的再生能力，使其长成新的植物体。如利用植株的根、茎、叶等及其变态部分块根、块茎、球茎、鳞茎、芽眼及枝条等，采用分根、扦插、压条及嫁接等方法繁殖后代。利用营养体繁殖后代的植物主要有：甘薯、马铃薯、甘蔗以及许多果树、花卉植物等。无性繁殖植物在一定的条件下可以进行有性繁殖，并存在自花授粉和异花授粉的区别。如马铃薯是典型的自花授粉植物，甘薯则为典型的异花授粉植物。无融合生殖是指植物的雌雄配子未发生核融合过程而形成种子以繁衍后代的方式。主要包括单倍配子体无融合生殖、二倍配子体无融合生殖和不定胚 3种类型。本实验以甘薯为例来说明无性繁殖植物的有性杂交技术。

甘薯属喜温、短日照植物，绝大多数品种在我国北方不能开花结实，通常需要用重复法或蒙导法处理亲本材料才能顺利地进行杂交工作。另外，甘薯还存在自交和杂交不亲和现象，品种之间还存在若干不亲和群。在组配亲本时，要注意双亲应属不同群别。

甘薯为聚伞花序，每朵花由 5个花瓣联合，呈漏斗形，雌雄同花，柱头二裂，上有乳状突起，子房上位，2～4室。雄蕊 5枚，长短不齐，围绕雌蕊着生于花冠基部。花药淡黄色，纵裂二室，花粉球形，黄白色，表面有许多凸起，带黏性。

甘薯在气温不太高的季节开花，花期较长，在我国北方一般出现两个开花高峰，6月中至 7月初，8月中至 9月初。但以第 2个高峰为杂交主要时期，现蕾开花多，结实率高。甘薯每天的开花时间是 5∶00—11∶00，以 6∶00—11∶00授粉结实率高。每朵花从现蕾至花冠脱落，约经 48 h，花冠午后凋萎，次日早脱落。甘薯单株开花顺序是先从茎蔓基部花序开始，逐渐向顶部花序开放，每个花序的开放顺序是先中央主轴花开放，然后两侧枝花蕾交互开放。

实验目的是通过实际观察和操作，了解无性繁殖植物的开花结实习性，并初步掌握其有性杂交技术，根据结果探讨不同杂交组合的结实情况，获得目的性杂交种子以丰富育种的原

始材料。

一、试材及用具

1. 试材

供杂交用的亲本材料由任课教师按课程需要选择，如甘薯（地瓜）、马铃薯、生姜、大蒜及石榴等。

2. 用具

镊子、回形针、授粉器、放大镜、指形管（或小玻璃瓶）、干燥器、培养皿、花粉筛、剪刀、75%酒精棉球、纸袋、纸牌及铅笔等。

二、方法步骤

（一）隔离

为防止昆虫传粉，杂交前和授粉后要对亲本花朵进行隔离。每天 17∶00开始用回形针夹住花冠顶部，授粉后仍需继续隔离。

（二）采粉

杂交前先取下父本花朵上的回形针，用嘴吹开花冠，用镊子取出花药放于培养皿中，注明父本名称，以备授粉，或取下父本花朵，边取花粉边授粉。花粉要避免阳光直射，防止降低生活力，更换杂交材料时，需要对授粉工具酒精消毒，防止混交。

（三）去雄

甘薯杂交时，母本去雄与否，应根据杂交目的和母本自交结实情况灵活掌握，除进行不亲和群测定以及遗传研究时需要严格进行去雄操作外，一般杂交育种可对自交不亲和及育性很低的材料不去雄。去雄时最合适的时间是在开花前一天 17∶00后进行：选次日要开的花朵，用镊子从一侧划一条纵缝，用食指压迫花冠顶部的裂口张开，将镊子伸入取出全部雄蕊，然后套上纸袋予以隔离。

（四）授粉

授粉一般在 5∶00—11∶00进行，授粉前先取下母本花朵上的隔离回形针，用嘴吹开花朵，再用镊子将采集的父本花药夹住，将花粉涂于柱头上。一个花药可涂 3～5朵花。授粉后将花冠折叠，用回形针夹住或用手捏合，黏住花冠顶部，仍继续保持隔离，并在杂交花梗上挂上一小纸牌，写上杂交组合、日期等。

（五）授粉后的管理

杂交后的最初几天要检查纸袋，如脱落、破碎则可能发生了意外的杂交，这些杂交花就无效了，应重新补做杂交。一周左右，花瓣开始凋谢，幼果渐渐长大时，就可以除去纸袋，以便幼果得到充分发育，同时要防止风、鸟以及病虫的危害。果实达到生理成熟后及时采收，检查结实率。

三、作业思考题

1. 交回得到的目的性杂交种子或果实。并将所得结果填于表 1—4，以实习小组为单位汇总结果，并分析成功或失败的经验或教训，提出你的改进意见和建议。

表 1－4

杂交组合	去雄日期	去雄花数	授粉日期	授粉花数	结实数	结实率	备注

2. 无性繁殖植物的杂交过程中应该注意的问题有哪些？为什么？

3. 无性繁殖植物和有性繁殖植物在杂交过程中的异同点有哪些？

（潘敏）

实验 5　植物不育性的观察与鉴定技术

雄性不育是指在两性花植物中雄蕊败育的现象。有些雄性不育现象是可以遗传的，采用一定的方法可育成稳定遗传的雄性不育系。雄性不育系在杂交过程中有着重要的作用，我们都知道，杂种优势普遍存在，但很多植物由于单花结籽量少，获得杂交种子很难，从而使杂交种子生产成本太高而难以在生产中应用，利用雄性不育系配制杂交种是简化制种的有效手段，可以降低杂交种子生产成本，提高杂种率，扩大杂种优势的利用范围。雄性不育的遗传类型可以分成下列 3 种：细胞质雄性不育类型、细胞核雄性不育类型和核质互作雄性不育类型。

无论植物的不育性是哪种类型，它们都会在一定的组织中表现出来，有些时候不育株还会影响到内源激素的变化等。十字花科、伞形科、百合科及茄科等蔬菜作物中，普遍存在不同程度的雄性不育现象。由于遗传机制、植株营养状况、温度高低及病毒侵染与否等的不同，雄蕊退化大概可分成以下几种类型：

（一）花药退化型

一般表现为花冠较小，雄蕊的花药退化成线状或花瓣状，颜色浅而无花粉。

（二）花粉不育型

这一类花冠、花药接近正常，往往呈现亮药现象或褐药现象，花药中无花粉或有少量无效花粉，镜检时，有时会发现少量干瘪、畸形以及特大花粉粒等，大多数是无生活力的花药。

（三）花药不开裂型

这类不育型虽然能形成正常花粉，但由于花药不开裂不能正常散粉，花粉往往由于过熟而死亡。

（四）长柱型功能不育

这一类型花柱特长，往往花蕾期柱头外露，虽然能够形成正常的花粉，但散落不到柱头上去。

（五）嵌合型不育

在同一植株上，有的花序或花是可育的，而有的花序或花则是不育的，在一朵花中有可育花药，也有不育花药。

上述 5种雄性不育型中以（一）、（二）两种类型为佳，利用较为方便，稳定可靠。除了上述 5 种雄性不育型外，还有其他类型，如环境敏感型雄性不育。根据上述不同雄性不育类型识别、鉴

定和选择雄性不育株，是对雄性不育材料鉴定和选择的主要方法。但是，对花粉不育型通常不能用肉眼直接进行鉴定，需要用显微镜镜检，通常把过大、过小或畸形花粉作为无生活力花粉计算，统计不育率。这种镜检方法只能作为相对的直观判断，要作出准确的判断还得进行人工授粉直接测定。随着科学技术的发展，分子生物学的运用越来越广泛，植物不育性的观察和鉴定，也可借助分子生物学的手段进行，从而可以从基因水平上了解不育性的机制。

实验目的是学习识别、鉴定雄性不育株的方法，并了解不同植物不育性的表现类型，通过本实验操作，学会利用不同的实验方法来鉴定植物的不育性，自行设计测交筛选保持系的方法。

下面就以萝卜为例来说明观察和鉴定不育株的几种方法。

一、试材及用具

1. 试材

供观察和鉴定用的材料，包括大白菜、甘蓝、萝卜及辣椒等雄性不育材料的开花种株。

2. 用具

显微镜、镊子、凹载玻片、指形管、培养皿、离心机及电泳槽等。

3. 试剂

醋酸洋红、正丙酸洋红、缓冲液、饱和酚、凝胶以及电泳缓冲液、0.7% 琼脂糖、溴化乙啶、氯仿、冷乙醇、纳瓦兴液、艾氏苏木精、二甲苯、石蜡、戊二醛、高锰酸钾溶液、双蒸水、$MgCl_2$、DNA 酶、蛋白酶及标准蛋白等。

二、方法步骤

（一）细胞形态学观察

在开花期取植株主茎顶端整个总状花序，按发育时期选取不同蕾长（分别为 1～2 mm、3 mm、4 mm、5 mm、6 mm 和 7～8 mm）的花蕾，剥出花药，经镜检确定小孢子发生的 5 个时期：四分体时期、单核早期、单核晚期、二胞花粉期和三核花粉期。

光学显微镜观察：花药用纳瓦兴液固定，流水冲洗，梯度酒精脱水至 70% 酒精时，转入稀释的艾氏苏木精中整体染色，再经梯度酒精脱水，二甲苯透明，石蜡包埋，连续切片，其切片厚度为 5～7 μm。Olympus BH2 型显微镜观察并拍照。

扫描电镜观察：从花瓣即将张开的花蕾中取出花药并立即放入 2.5% 戊二醛（0.05 mol/L，pH 7.2）中固定，磷酸缓冲液冲洗后换入 1% 高锰酸钾溶液内再固定 30 min；双蒸水冲洗，梯度酒精脱水；临界点干燥后剥开药室，LB－3 型喷镀仪喷薄层黄金，S－520 型扫描电镜观察，拍照记录。

萝卜雄性不育系花药和小孢子发生的细胞形态学观察：

1. 小孢子败育

不育系中小孢子母细胞减数分裂时的某些不同步现象与其保持系基本相同。由四分体初释出的早期单核小孢子与保持系也无可见差异。但当单核小孢子的细胞质内出现小液泡时，这些小孢子即呈现败育现象，如细胞质浅染，外粉壁停止发育而显得较薄，整个小孢子小于保持系相应时期的小孢子。单核晚期的小孢子败育更趋明显：细胞质稀薄并收缩；细胞核染色也变淡，甚至在有的细胞核内只见到深染的核仁；小孢子形状不规则且大小不等。以后，小孢子的内含物愈益减少，小孢子彼此黏连，在进入雄配子体发育之前就已逐渐解体成为空壳或仅留下少量残余

物，并被高度液泡化的膨大绒毡层细胞挤到药室腔中央，最后与解体的绒毡层细胞黏成团块，终至消失，开花期的花药内均未见花粉粒。

2. 绒毡层异常

花药发育中药室的绒毡层细胞异常是十分普遍的现象。其细胞质内早在四分体时期即有液泡出现，胞质淡染；进入单核小孢子时期，绒毡层细胞内液泡化更加明显，整个细胞迅速膨大且凸向药室腔，细胞径向壁渐模糊；相当于单核小孢子晚期时，绒毡层细胞中的液泡继续扩大，细胞也异常肥大，常在原位彼此黏接，把败育小孢子群围在药室中央。以后，这种畸形的绒毡层和败育小孢子消失，或在药室内残留极少量的解体物。这时的花药壁也都皱缩。

（二）外部形态鉴定（花器形态以及花粉生活力观察）

在田间观察、鉴定指定作物的雄性不育株，观察记载不同不育类型，并将其不育类型加以区分。将花药可能有花粉的不育株的花，采集起来装入指形管，在管外标签上注明株号、雄性不育类型，带回室内。把不同类型雄性不育花的花药用镊子取下来，放到凹载玻片的凹处或平载玻片中央，滴上一滴醋酸洋红或正丙酸洋红，用镊子尖把花药捣碎，除去药壳及花丝等，然后放到显微镜下镜检，观察花粉形态、大小以及着色深浅等。一般瘦小干瘪、过大或畸形的花粉为无生活力或生活力弱的花粉，着色深者生活力较强，不着色者无生活力，着色浅者为生活力较弱的花粉。但是特大花粉往往着色较深，但不能正常发芽，也归于无生活力花粉之内。

（三）分子鉴定法（叶绿体 DNA的限制性内切酶分析）

1. 配制试剂

配制缓冲液 A、B、C、TE溶液、饱和酚、凝胶以及电泳缓冲液、0.7%琼脂糖、溴化乙啶，其中缓冲液 A

EDTA－Na_2 0.003 mol/L，β－巯基乙醇 0.001 mol/L，Tris－HCl 0.05 mol/L，牛血清蛋白 0.05%，pH8.0。

缓冲液 B

Tris－HCl 0.05 mol/L，EDTA－Na_2 0.02 mol/L，pH 8.0。

缓冲液 C

Tris－HCl 0.1 mol/L，EDTA－Na_2 0.05 mol/L，NaCl 1 mol/L，SDS 2%，pH8.5。

缓冲液 TE

Tris－HCl 10 mmol/L，EDTA－Na_2 1 mmol/L，pH8.0。

2. 样品提取

300 g叶片，加 3倍体积缓冲液 A，匀浆，过滤，1 500 r/min 4℃下离心 10 min，叶绿体沉淀用缓冲液 A洗两次，最后悬浮于 20 mL缓冲液 A中，加 $MgCl_2$ 至 0.01 mol/L，DNA酶 50 μg/mL，4℃保温 1 h，加 150 mL缓冲液 B，加胰蛋白酶（终质量浓度 0.6 mg/mL），水浴 60 min，1 500 r/min 4℃下离心 15 min，并上清液，沉淀用缓冲液 B反复洗 3次，最后把叶绿体悬浮于 15 mL缓冲液 C中，37℃水浴 20 min，加等体积（15 mL）饱和酚－氯仿异戊醇（体积比 24∶24∶1），抽提 20 min，12 000 r/min 4℃下离心 15 min，提取水相，反复提取两次。加两倍体积的冷乙醇于－20℃冰箱中过夜。1 500 r/min 4℃下离心 10 min，再加 70%冷乙醇洗两次，经低温真空冷冻干燥，溶于 TE缓冲液中于 4℃下保存备用。

3. 限制性核酸内切酶消化

限制性核酸内切酶消化，EcoRⅠ，BamHⅠ。

4. 电泳

用 0.7%琼脂糖凝胶作单向垂直板电泳，稳压 30 V，15～20 h，在 0.5 μg/g溴化乙啶中染色 30 min，在 60 nm紫外灯下观察并拍照。标准蛋白为 Phamacia公司产品。EcoRⅠ和 BamHⅠ为中国科学院生物物理所生化试剂厂产品。

叶绿体 DNA用 EcoRⅠ消化后的电泳图式：用 EcoRⅠ消化萝卜雄性不育系 401A与 401B（保持系）的 ctDNA内切酶切割的片段，从单向 Agarose凝胶电泳分离的 ctDNA限制性片段可以看出，用 EcoRI消化 ctDNA，不育系可以分离出相对分子质量不同的 13个片段，保持系可以分离出相对分子质量不同的 15个片段。不育系与保持系的 ctDNA相比较，不育系缺 E_2 和 E_4 片段，而且保持系的 E_5，E_7，E_{16}片段比不育系要宽，从 ctDNA的单向 AGE图式上，只能分辨出相对分子质量不同的片段，不能说明 DNA的顺序和碱基排列的差异。把环状 ctDNA分子从特异位点切开，分割成相对分子质量不同的一些片段，这些片段之间的差异，也可反映不育系与保持系的 ctDNA基因结构的某些差异。

三、作业思考题

1. 利用哪几种方法可以鉴定植物的不育性？比较它们的异同点。
2. 本实验所列举的方法之外，还有其他的什么方法可以鉴定植物的不育性？
3. 植物不育性分成哪些类型？试举例说明。
4. 你认为雄性不育性状为什么有如此多的多样性？
5. 对核质型雄性不育（MS）和胞核质型雄性不育（CMS）如何根据花器形态性状和群体雄性不育株率等加以区分？

（杨建平）

实验 6　植物自交不亲和性测定技术

自交不亲和性在白菜、甘蓝等十字花科蔬菜中是普遍存在的，其遗传机制也较相似。自交不亲和株正开放花的柱头上，如果授予同株或同系统的花粉时，柱头就被激发产生胼胝质等物质，阻碍花粉发芽和花粉管发育，故不能正常受精结实，不结籽或结少量种子；而授予别的品种或系统的花粉时，则柱头不会被激发产生这类物质，故能正常受精结实。可是，在花蕾柱头上，即使授予同株或同系统的花粉也不会被激发这种反应，因此可通过蕾期人工控制自交获得自交不亲和系的种子。

胼胝质是 β－1，3－葡聚糖，通常分布于高等植物的筛管、新形成的细胞壁、花粉粒以及花粉管中，将其用苯胺蓝染色后，在紫外光激发下，可发出黄至黄绿色的荧光。因此，把授粉后经苯胺蓝染色的子房放到荧光显微镜下观察，可看到花粉在柱头上萌发，花粉管发育的状态，以及胼胝质在柱头表面的沉积状况等，进而判断花粉与柱头是否亲和。

实验目的是学习花期人工控制自交，测定选择自交不亲和系和蕾期自交繁殖自交不亲和系的方法，掌握用荧光显微镜检测植物自交不亲和性的技术，通过本实验加深对自交不亲和系选育过程的理解。

一、试材及用具

1. 试材

白菜、甘蓝及萝卜等十字花科花期的种株。

2. 用具

荧光显微镜、广口瓶（20～50 mL）、载玻片、盖玻片、镊子、铅笔、纸牌、纸袋、细铁丝、细竹竿及脱脂棉等。

3. 试剂

甲醛、冰醋酸、无水酒精、普通酒精、磷酸钾、苯胺蓝、氢氧化钠、甘油及蒸馏水等。

二、方法步骤

（一）人工自交测定法

1. 每人选 3～5株发育健壮已开花的种株，每株上选 3～4个花序。将其上已开的花和角果摘除，然后套上隔离纸袋，把袋口用细铁丝扎紧防止昆虫进入，于植株旁插一细竹竿，用绳把纸袋绑到细竹竿上保持固定，防止花序被风吹断，并在竹竿上挂一纸牌作标记。

2. 2～3 d以后，当每个花序上有 10朵左右花开放时，解除纸袋，在已开的花和蕾之间绑一条线作为区分标记，同时在每个花序上选择 10个左右大蕾，把其余的小蕾用镊子去掉，并用镊子把花蕾顶端的花被去掉一部分使柱头露出，切勿伤害柱头。再用镊子摘取本株隔离袋内已开花的花药，把花粉同时抹到已开的花和破蕾的柱头上，进行人工花期和蕾期自交。授粉完毕，于每个花序下面挂上纸牌，注明花期自交花数、蕾期自交蕾数、授粉者姓名和授粉日期。最后用纸袋按原来的套袋隔离方法进行套袋隔离。

3. 授粉 2～3 d后要及时提袋，防止花序于袋内顶弯或折断。在暴风雨后，要及时检查，如发现被风吹雨打破裂的隔离袋要及时修补或更换，被风吹倒了的植株要轻轻扶起来加以重新固定，切防折断。

4. 在授粉后 7～10 d花瓣脱落之后，可将隔离袋摘除，去掉多余花枝及后来陆续抽出的花枝，确保花序的发育。以后除按一般种株管理之外，应特别注意防止蚜虫、霜霉病等病、虫害。

5. 当角果变黄后，可把角果带花枝剪下装入纸袋，拿到室内风干考种（表 1－5）。

表 1－5　考种调查记载表

株号	花序号	花期授粉			蕾期授粉		
		授粉花数	结果数	种子粒数	授粉蕾数	结果数	种子粒数
1	1 2 3 4						
2	1 2 3 4						

（二）荧光鉴定法

1. 预先配制几种试剂

⑴ FAA固定液

将 40%甲醛、80%酒精和冰醋酸，按 1∶8∶1的比例配制而成。

⑵ 卡诺固定液

用 3份无水酒精和一份冰醋酸配制而成。

⑶ 0.3 mol/L磷酸钾水溶液

称取 71 g磷酸钾，用蒸馏水定容至 1 000 mL。

⑷ 0.1%苯胺蓝溶液

称取 0.1 g水溶性苯胺蓝，用 0.3 mol/L磷酸钾水溶液定容至 100 mL。

⑸ 8 mol/L氢氧化钠溶液

称取 32 g氢氧化钠，用蒸馏水定容至 100 mL。

2. 取样、固定和保存

解开人工控制自交授粉 6～12 h的花枝上的纸袋，摘取子房，于花柱基部切下花柱，将花期授粉和蕾期授粉的花柱分别固定于 FAA固定液或卡诺固定液中，24 h后，转移到 70%酒精溶液中保存。在瓶上注明株号、花期授粉还是蕾期授粉处理以及实验者姓名。

3. 透明和软化

将上述固定材料用水冲洗后，转移到指形管中，用 8 mol/L氢氧化钠浸泡 8～24 h。

4. 染色

把软化后的试材用自来水多次换水浸泡 1 h以上，除去大部分氢氧化钠之后，转移到 0.1%苯胺蓝染液中染色 4 h左右。

5. 观察

用镊子挑取一枚染色后的花柱，放在载玻片上，用滤纸吸出染液，滴上一滴甘油，盖上盖玻片，轻轻敲压盖玻片，使花柱展开。然后把载玻片放到荧光显微镜下，观察记载每株柱头胼胝质沉积状况，花粉萌发及花粉管生长状态。

三、作业思考题

1. 按照上表中的数据资料，统计每株的亲和指数，即亲和指数 =每株结子粒数 /每株自交花数，并将资料进行合理分析。

2. 根据花期自交和蕾期自交柱头胼胝质沉积情况以及花粉管生长状况，判断取样株自交亲和与否，绘出亲和株和不亲和株花粉发芽以及生长状态图。

3. 本实验采用的第一种方法中，有哪些技术环节是可以变化的？

4. 花期人工控制自交测定自交不亲和性产生误差的原因有哪些？

（杨建平）

实验 7　植物花粉生活力测定技术

在育种工作中，有时需要将花粉保存一段时间。虽然人们已经知道，花粉保存以温度较低

(0～15 ℃),空气湿度稍干 (不能太干),黑暗条件下为宜,但是各种不同植物花粉寿命长短相差悬殊,这一是由花粉本身的特征决定的,二是由贮藏条件决定的。一般来说,禾谷类作物花粉的寿命较短,自花授粉植物花粉的寿命尤其短,如小麦在花药开裂后 30 min,花粉即由鲜黄色变为深黄色,此时已有大量花粉丧失活力。在许多特殊条件下,花粉生活力的测定显得很重要,如:

1. 外地采集来的花粉或杂交时父本花期早于母本时都要将花粉进行短暂贮藏。

2. 自交或远缘杂交时,为了分析结实率或不结实原因时。

3. 为了鉴定雄性不育系时。

4. 了解某些杂交技术时,如测定花粉的刺激等作用,测定受精选择性等。

要根据各种植物花粉的特点,采取适当的保存方法。花粉生活力的测定方法很多,其中发芽试验手续较复杂,设备要求较高,需时也较长。为了简易而迅速地测定花粉生活力,也常采用化学染色的方法,但是此法也有缺点,染上色的花粉不一定都具有生活力,因为染上色的花粉中也包括了那些生活力弱不能正常发芽的花粉,所以一般常用而且较为可靠的方法仍然是花粉发芽实验。若要求不严格,对新采集的花粉还有一个较简便的鉴定方法——形态鉴定法。

本实验目的是学习花粉生活力测定的方法,进而研究花粉寿命长短与环境条件的关系,以探求保存花粉的合适方法。

一、试材及用具

1. 试材

几种植物的不同处理花粉,如小麦、玉米、大白菜、黄瓜、杏及苹果等。

2. 用具

显微镜、载玻片、盖玻片、双凹载玻片、玻璃棒、擦镜纸、吸水纸、标签纸及铅笔等。

3. 试剂

配制好的缓冲液、联苯胺液、过氧化氢液、TTC 粉、蔗糖及琼脂等。

二、方法步骤

(一) 直接检验法

每个实验小组选定同品种种株去雄。注意:选用的花蕾最好是花前 1～2 d,且发育正常,饱满。每天去雄 20个花蕾,然后套袋隔离,连续 5 d,共 100朵花。这一实验要和花粉贮藏实验相配合,即花粉贮藏的当天开始去雄。授粉时,每去雄一次,分别授以两种不同贮藏条件下的花粉 (各 10朵),连续 5 d,就使得贮藏期分别为当天、第二天、第三天、第四天、第五天的花粉授到了去雄后的花蕾上。实验时,一定要挂牌标好品种、花粉贮藏期、贮藏条件、株号、授粉日期及授粉人。等最后一个处理完后 10 d,检验结实率和结籽率。将得到的结果写入实验报告。

(二) 染色鉴定法 (TTC法)

TTC即 2, 3, 5—三苯基四唑氯化物。主要原理在于检验花粉呼吸过程中脱氢酶的活性。具有生活力的花粉的脱氢酶,在催化去氢的过程中,把氢转移到其他物质上去,使用 TTC与催化过程中产生的氢结合成红色化合物,从而使具有生活力的花粉变为红色。

1. 先配制下列溶液

(1) 磷酸缓冲液

在 100 mL的蒸馏水中，溶解 0. 832 g磷酸氢二钠和 0. 273 g磷酸二氢钾，调整 pH为 7. 17。

⑵ TTC溶液

称取 0. 02～0. 05 g（不同植物所用的量是不同的）TTC溶解在 10 mL的磷酸缓冲液中，溶液配好后装入棕色滴瓶内，置入暗处，因氯化三苯基四唑有毒，操作时要注意安全。

2. 操作步骤

⑴ 取少量花粉放在载玻片上，并在花粉上滴上 1～2滴配制液，用玻璃棒混合后盖上盖玻片。

⑵ 将载玻片置于恒温箱中（35～40 ℃）约 15～20 min。

⑶ 在显微镜（10×10）下观察：凡具有生活力的花粉呈红色，部分丧失生活力的呈淡红色，无色的是死的和不育的花粉粒。

3. 观察和测定结果

每片观察 3个视野，并统计具有生活力花粉的百分率，填入表 1－6。

（三）发芽测定法（培养基培养法）

1. 培养基的配制

常用的花粉发芽培养基有液体和固体两种。以前者最为简便，本实验选用前者。其有效成分主要有：蔗糖、硼酸、柠檬酸及赤霉素等。不同的植物所用的蔗糖培养液的浓度是不同的，配制 3% ～30% 的蔗糖培养液：在 100 mL水中，加糖 3～30 g加热溶解后，再加 0. 1% 硼酸数滴。

2. 制片

取双凹载玻片，滴 2滴培养液于槽中，用解剖针挑少许花粉均匀撒于培养液的表面（注意不必搅拌，以防花粉混于液体中因缺少空气而影响发芽，又因花粉深浅不一而在显微镜检查时因光线折射而不易观察）。处理好后，放于一下部添有少量蒸馏水，内有两根玻璃棒的培养皿中（注意不要使水没过载玻片），放到恒温为 25 ℃左右的恒温箱中或室内 2 h。

3. 镜检

将放置 2 h后的载玻片取出，放在显微镜下观察 3个视野，统计总花粉数与发芽的花粉数，然后计算比例，填入下面的表格中。

（四）形态鉴定法

对于新采集的花粉来说，还有一个更为简便的鉴定方法——形态鉴定法。将花粉用解剖针播于一般载玻片上，然后直接放到显微镜下观察，根据形态特征，判断花粉的生活力状况。一般来说，畸形、皱缩、小型化等均为无生活力花粉，而有光泽，饱满，具有本品种花粉典型特征等性状的均为有生活力花粉。将观察的结果统计一下填写下表格。

三、作业思考题

1. 测定花粉生活力的意义有哪些？

2. 分析在实验中出现的问题，并找出原因所在。

3. 将 3种方法的结果分别记载于表中，并比较结果是否一致，如不一致，分析其原因。

表 1－6

	供试品种	花粉收集日期	测定日期	具有生活力的花粉			备注
				第一视野	第二视野	第三视野	
染色鉴定法							
发芽测定法							
形态鉴定法							

（潘敏）

第二章　创造植物变异的新技术

实验 8　植物组织培养技术

植物组织培养（plant tissue culture）是指在无菌条件下，将离体的植物器官（根、茎、叶、花等）、组织（如形成层、花药组织、胚乳、皮层等）、细胞（体细胞和生殖细胞），以及原生质体，培养在人工配制的培养基上，给予适当的培养条件，使其长成完整的植株。植物组织培养的过程可概括为：

外植体 —脱分化→ 愈伤组织 —再分化→ 根、茎、叶等器官 或 胚状体 → 完整植株

茎尖、胚及子房等器官做外植体可不经脱分化直接形成试管苗。

植物组织培养技术是生物技术的重要组成部分，在生产实践及基因工程、遗传转化等研究中有重要应用前景。植物脱毒及离体快繁，花药培养与单倍体育种，幼胚培养与试管受精，抗性突变体的筛选与体细胞无性系变异，植物产品的工厂化生产等方面的研究和应用，均必须借助植物组织培养技术的基本程序和方法。

通过本实验，要求同学掌握植物组织培养操作技术，了解外植体脱分化及再生的过程，理解植物细胞全能性。

一、试材及用具

1. 试材

花生、烟草、苹果、大白菜及玉米等。

2. 实验室

准备室、接种室及培养室等。

3. 用具

高压灭菌锅（器）、光照培养箱、振荡培养箱、天平、酸度计、超净工作台、镊子、手术刀、接种针、细菌过滤器、记号笔、三角瓶、培养瓶、培养皿、量筒及容量瓶等。

二、方法步骤

（一）培养基的制备

1. 母液的配制

在植物组织培养中，不同的植物，不同的器官和组织，不同的研究目的，使用不同的培养基。培养基千差万别，按其性质和含量来分主要由以下几部分组成：

① 无机营养，包括大量元素和微量元素。

② 有机物质。

③ 铁盐。

④ 糖类。

⑤ 天然复合物。

⑥ 激素。

⑦ 琼脂（固体培养基）。

⑧ 其他添加物。

在培养基的配制中，对各成分，常先按其需用量扩大一定倍数，配制成母液（表 2－1）。

表 2－1　MS培养基母液配制

类别	成分	规定量/mg	称取量/mg	母液体积/mL	扩大倍数	配 1L培养基的吸取量/mL
大量元素	KNO_3	1 900	19 000	1 000	10	100
	NH_4NO_3	1 650	16 500			
	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	370	3 700			
	KH_2PO_4	170	1 700			
	$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	440	4 400			
微量元素	$MnSO_4 \cdot 4H_2O$	22.30	2 230	1 000	100	10
	$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	8.6	860			
	H_3BO_3	6.2	620			
	KI	0.83	83			
	$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	0.25	25			
	$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0.025	2.5			
	$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	0.025	2.5			
铁盐	EDTA—Na_2	37.25	3 725	1 000	100	10
	$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	27.85	2 785			
有机物质	甘氨酸	2.0	100	500	100	10
	盐酸硫胺素	0.4	20			
	盐酸吡哆素	0.5	25			
	烟酸	0.5	25			
	肌醇	100	5 000			

配制母液时应注意以下两个方面：

⑴ 配制大量元素母液时，为了避免产生沉淀，各种化学物质必须充分溶解后才能混合，同时混合时要注意先后顺序，把钙离子（Ca^{2+}）、锰离子（Mn^{2+}）、钡离子（Ba^{2+}）和硫酸根（SO_4^{2-}）、磷酸根（PO_4^{3-}）错开，以免形成硫酸钙、磷酸钙等沉淀，并且各种成分要慢慢混合，边混合边搅拌。

⑵ 各类激素用量极微，其母液一般配制成 0.1～1 mg/mL。有些激素不溶于水，需经加热或用少量稀酸、稀碱及 95%酒精溶解后再加水定容。常用激素类的溶解方法如下：

① 萘乙酸（NAA）

先用热水或少量 95%酒精溶解。

② 吲哚丁酸（IBA）

先用少量 95%酒精溶解后加水，如溶解不完全则加热。

③ 激动素（KT或 KIN）

要先溶于 1 mol/L盐酸。

④ 6－苄基腺嘌呤（6－BA）

要先溶于 1 mol/L盐酸。

⑤ 玉米素（ZT或 ZEA）

先溶于 95%酒精，再加热水。

⑥ 2,4－D

需用 1 mol/L NaOH溶解再定容。

2. 培养基的配制、分装及灭菌

根据培养基的成分及用量，吸取各种母液，称取蔗糖（一般用量 3%），加水至所需体积，待蔗糖全部溶解后，用 1 mol/L的 NaOH或 HCl调酸碱度至 pH5.8，加入琼脂粉（一般 6.5～8 g/L），加热使琼脂完全熔化，蒸馏水补齐溶液体积，分装在三角瓶或培养瓶中，高压灭菌。不耐高温的培养基成分，需过滤灭菌。

（二）外植体取材、消毒及接种

1. 取材与消毒

自大田取材或温室取材时应选取无病，无虫，生长健康的外植体。外植体表面消毒的一般程序为：外植体→自来水多次漂洗→消毒剂处理→无菌水反复冲洗→无菌滤纸吸干。常用消毒剂的种类、使用质量浓度及消毒时间等见表 2－2。

表 2－2　常用消毒剂的使用及效果

消毒剂	使用质量浓度	消除难易	消毒时间 /min	灭菌效果
次氯酸钠	2%	易	5～30	很好
次氯酸	9%～10%	易	5～30	很好
漂白粉	饱和溶液	易	5～30	很好
升汞	0.1%～1%	较难	2～10	最好
酒精	70%～75%	易	0.2～2	好
过氧化氢	10%～12%	最易	5～15	好
溴水	1%～2%	易	2～10	很好
硝酸银	1%	较难	5～30	好
抗生素	4～50 mol/L	中等	30～60	较好

（引自潘瑞炽，2001）

2. 无菌操作

⑴ 接种室消毒

超净工作台面用 70%酒精拭擦，打开紫外灯照射 20 min，进行无菌室及超净工作台杀菌。

⑵ 材料的接种

操作人员接种前必须剪除指甲，并用肥皂水洗手，用 70%酒精拭擦。接种时最好戴口罩，必须在近火焰处打开培养容器的瓶口，并使瓶倾斜（瓶口低，瓶底高），以免空气中的微生物落入瓶内。

（三）无菌培养与观察

接种后将材料放入培养室或培养箱内培养，温度一般为（25±2）℃，光照 10～16 h，光强 1 000～2 000 lx，有的材料需要暗培养。定期观察，继代培养（或转接培养）。

三、植物组织培养程序实例

（一）花生胚小叶片的离体培养

1. 培养基成分

供试培养基成分见表 2－3。

表 2－3　供试培养基成分

培　养　基	成　　分
MS	MS无机盐 ＋MS有机物 ＋30%蔗糖 ＋0.8%琼脂 pH5.8
不定芽诱导培养基	MS＋4 mg/L BA＋1 mg/L NAA
不定芽伸长培养基	MS＋1 mg/L BA＋0.5 mg/L KIN＋2 mg/L IAA
不定根诱导培养基	MS＋0.2 mg/L NAA
胚性愈伤诱导培养基	MS＋10 mg/L 2,4－D

2. 外植体的取材、接种及培养

剥取花生种子完整的成熟胚，70%酒精消毒 1 min，0.1%升汞消毒 15 min，无菌水洗 4次，每次 5 min，用无菌水泡 16～18 h。将浸泡的胚在无菌条件下切取小叶片，分别接种在不定芽诱导培养基和胚性愈伤诱导培养基（成分见表 2－3）上，培养 20 d观察外植体在两种培养基上形成芽丛及愈伤的形态，统计诱导率。

3. 获得花生试管苗

⑴ 器官发生途径

胚小叶片诱导的丛生芽转接入不定芽伸长培养基中诱导芽伸长。再生芽长至 2～3 cm时，转入不定根诱导培养基中诱导生根，获得再生植株。

⑵ 胚胎发生途径

胚小叶片诱导的胚性愈伤转接入 MS培养基诱导胚状体发育，获得再生植株。

（二）苹果茎尖培养

1. 春季剪取 5 cm左右新梢茎尖，消毒后切取茎尖或带芽的茎段，接种在 MS＋2 mg/L BA的培养基上培养诱导芽伸长。

2. 把伸长的芽切段接种到 MS＋1 mg/L BA＋0.5 mg/L KIN＋2 mg/L IAA的培养基上培养，获得丛生芽。

3. 切取约 2 cm长的芽，浸入 100 mg/L IBA液体培养基中 15～30 min，接种在 1/2MS（蔗糖 20 g/L）的培养基中，培养 20 d获得生根试管苗。

4. 生根苗移出，砂培 2～3周，移入土壤中生长。

（三）大白菜侧芽培养

切取 2～4 mm长的腋芽，70%酒精表面消毒，10%漂白粉消毒 20～30 min，接种于 MS＋5 mg/L BA＋2 mg/L IAA的培养基中培养，侧芽伸长后转入 MS＋1 mg/L BA＋2 mg/L NAA的培养基中诱导生根，形成试管苗。

（四）玉米花药培养

1. 选取花粉处于单核期较多的雄穗，剥去苞叶，雄穗用 20%次氯酸钙表面消毒约 5 min，用无菌水冲洗 3～4次。

2. 无菌条件下取单个小穗，剥出花药接种在 MS＋2 mg/L 2,4－D＋0.5 mg/L ZEA的培养基上，暗培养，诱导花粉愈伤组织。

3. 愈伤组织长至 2～3 mm时，移到分化培养基 MS＋1.5 mg/L KIN＋0.5 mg/L IAA，诱导形成再生植株。

四、作业思考题

1. 简述植物组织培养操作应注意的问题。

2. 根据自己的实验统计外植体的污染率、诱导脱分化率和植株再生率。

（刘凤珍）

实验 9　植物原生质体培养技术

植物原生质体是除去细胞壁的裸露植物细胞，植物原生质体的培养可应用于外源基因转移，体细胞杂交，无性系变异及突变体筛选等研究，是进行植物遗传改良的有效途径之一。

植物原生质体培养获得再生植株的过程可分以下 4个环节：

1. 原生质体的分离和纯化

植物的幼嫩叶片、子叶、下胚轴、未成熟果肉、花粉四分体、培养的愈伤组织和悬浮培养细胞均可作为分离原生质体的材料来源。分离原生质体有两种基本方法：机械分离及酶解法分离。酶解法分离最常用，植物细胞壁主要由纤维素、半纤维素和果胶质组成，因而常使用纤维素酶、半纤维素酶和果胶酶进行水解除去细胞壁。材料经过一段时间的酶解后，酶解混合液通过 30～80 μm的滤网过滤，除去未降解的组织和细胞，滤液低速离心（50～100 r/min，5 min）将完整的原生质体沉积在离心管底部，再用原生质体洗液或液体培养基重复洗涤数次，即可获得较纯净的原生质体。如果原生质体不纯，还必须用浮力密度悬浮法纯化。将 0.3～0.6 mol/L蔗糖加在试管底部，再缓缓注入原生质体悬浮液，避免两种溶液混合，低速离心。完整原生质体浮力密度较低，可以悬浮在两层液体的界面处，形成一条带状。吸取该层溶液并洗涤数次，即可获得纯化的原生质体。

2. 原生质体培养

获得有生活力的原生质体后，在适合其生长发育的培养条件下，原生质体可重新产生细胞壁并进行细胞分裂。培养方法对于原生质体的生长和分裂至关重要，不同植物的原生质体一般适应于不同的培养方法。一般认为，对于容易分裂的植物原生质体采用液体浅层和液体浅层—固体双层培养系统即可获得较好的结果；而对于难以分裂的植物原生质体，采用琼脂糖包埋、液体浅层—固体双层及看护培养系统较好。

3. 原生质体愈伤组织的形成和发育

原生质体培养一段时间后必须及时添加降低了渗透压的培养基，否则形成的细胞团和小愈伤组织无法继续发育。待小愈伤组织长至 1 mm左右时及时转移到固体培养基上，固体培养基的组分与愈伤组织培养基相同。

4. 原生质体植株的再生

当原生质体再生的愈伤组织达到 1～5 mm时，将其转移到分化培养基上，诱导器官分化或胚状体的形成，获得再生植株。

实验要求同学掌握植物原生质体分离和培养的基本方法，了解原生质体培养获得再生植株的过程。

一、试材及用具

1. 试材

柑橘、烟草幼苗叶片及水稻种子。

2. 用具

超净工作台、离心机、显微镜、灭菌锅、细菌过滤器和 0.45 μm滤膜、不锈钢网筛及配套小烧杯、解剖刀、尖头镊子、培养瓶、培养皿及吸水纸等。

二、方法步骤

（一）烟草叶肉细胞原生质体的培养

1. 试剂的配制

（1）酶液

2%纤维素酶，0.05%果胶酶，0.5 mol/L甘露醇，10 mmol/L $CaCl_2 \cdot 2H_2O$，0.7 mmol/L KH_2PO_4，pH5.7。

（2）培养基

① NT培养基

每升培养基含各种成分的质量（mg）如下：NH_4NO_3（825），KNO_3（950），$CaCl_2 \cdot 2H_2O$（220），$MgSO_4 \cdot 7H_2O$（1 233），KH_2PO_4（680），EDTA—Na_2（37.3），$FeSO_4 \cdot 7H_2O$（27.8），H_3BO_3（6.2），$MnSO_4 \cdot 4H_2O$（22.3），$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$（8.6），KI（0.83），$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$（0.25），$CuSO_4 \cdot 5H_2O$（0.025），$CoSO_4 \cdot 7H_2O$（0.030），蔗糖（10 000），肌醇（100），盐酸硫胺素（1），D—甘露醇（0.7 mol/L），pH5.8。

② 分化培养基

NT＋1 mg/L BA。

③ 生根培养基

MS＋0.2 mg/L NAA。

2. 原生质体的分离纯化

⑴ 取充分展开的叶片，用自来水冲洗干净。

⑵ 0.1%升汞浸泡 10 min，无菌水漂洗 4～5次。

⑶ 将叶片放入大培养皿中，用镊子撕去叶片下表皮，切成 3～5 mm见方的小块。以 1∶10 (m/V)的比例浸入 NT培养基中，28 ℃黑暗处理 3 h，进行质壁分离处理。

⑷ 质壁分离的材料，以 1∶10 (m/V)的比例与酶液混合，28 ℃黑暗处理 3～4 h。

⑸ 酶解液经 80～100目滤网过滤，500 r/min离心 5 min，收集原生质体。原生质体重新悬浮在 NT培养基中，于上述离心条件下洗 3次，获得纯净的原生质体。

3. 原生质体的培养与植株再生

⑴ 经过纯化的原生质体以 1×10^5 个/mL的密度悬浮于 NT培养基中，在直径为 6 cm的培养皿中加入 4 mL原生质体悬浮液，28 ℃培养。

⑵ 弱光 (300 lx)培养 3 d以后改为 1 500 lx光照培养。

⑶ 培养 2周后向培养皿中添加 1～1.5 mL无甘露醇的 NT培养基。

⑷ 再培养 2周后，将再生的愈伤组织转移到分化培养基上，诱导再生芽。

⑸ 再生芽转移到生根培养基上培养，形成完整的再生植株。

(二) 水稻愈伤组织原生质体培养

1. 试剂的配制

⑴ CPW 盐

每升含 KH_2PO_4 27.2 mg，KNO_3 101.0 mg，$CaCl_2\cdot2H_2O$ 1 480.0 mg，$MgSO_4\cdot7H_2O$ 246.0 mg，KI 0.16 mg，$CuSO_4\cdot5H_2O$ 0.025 mg，pH 5.8。

⑵ CPW －9M

CPW 盐 ＋9%甘露醇。

⑶ CPW －21S

CPW 盐 ＋21%蔗糖。

⑷ 酶液

纤维素酶 1%，果胶酶 Macerozye 0.25%，CPW 9 mol/L。

⑸ 培养基

① N6培养基

每升培养基含各种组分的质量 (mg)：KNO_3 (2 830)，$(NH_4)_2SO_4$ (463)，KH_2PO_4 (400)，$MgSO_4\cdot7H_2O$ (185)，$CaCl_2\cdot2H_2O$ (166)，$FeSO_4\cdot7H_2O$ (27.85)，EDTA－Na_2 (37.25)，$MnSO_4\cdot4H_2O$ (4.4)，$ZnSO_4\cdot7H_2O$ (1.5)，H_3BO_3 (1.6)，KI (0.8)，甘氨酸 (2.0)，盐酸硫胺素 (1.0)，盐酸吡哆醇 (0.5)，烟酸 (0.5)，蔗糖 (50 000)，pH 5.8。

② 愈伤培养基

N6＋2 mg/L 2,4－D＋1.0 g/L酪蛋白水解物。

③ 分化培养基

N6＋5 μg/L NAA＋2 mg/L苯氨基嘌呤。

④ 生根培养基

1/2MS+0.1 mg/L IBA。

⑤ KPR培养基

每升培养基含各种成分的质量(mg):NH_4NO_3(600),KNO_3(1 900),$CaCl_2 \cdot 2H_2O$(600),$MgSO_4 \cdot 7H_2O$(300),KH_2PO_4(170),KCl(300),Sequestrene 330Fe(复合铁盐,28),H_3BO_3(3.00),$MnSO_4 \cdot 4H_2O$(10.00),$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$(2.0),$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$(0.25),$CuSO_4 \cdot 5H_2O$(0.025),$CoCl_2 \cdot 6H_2O$(0.025),葡萄糖(68 400),蔗糖(250),果糖(125),核糖(125),木糖(125),甘露糖(125),鼠李糖(125),纤维二糖(125),山梨醇(125),甘露醇(125),丙酮酸钠(5),柠檬酸(10),苹果酸(10),延胡索酸(10),肌醇(100),烟酸(1),盐酸吡哆醇(1),盐酸硫胺素(10),D-泛酸钙(0.5),叶酸(0.2),对氨基苯甲酸(0.01),生物素(0.005),氯化胆碱(0.5),核黄素(0.1),抗坏血酸(1),维生素A(0.005),维生素D_3(0.005),维生素B_{12}(0.01),水解酪蛋白(125),椰子汁(10 mL/L),pH5.7。

2. 水稻成熟胚愈伤组织诱导

(1) 水稻成熟种子去皮,洗净,表面消毒,接种在愈伤诱导培养基(1/2MS+2 mg/L 2,4-D)上。胚部分不能接触培养基。

(2) 26℃,暗培养。

3. 悬浮细胞系的建立

(1) 选取25~50块较小的胚性愈伤块(小于5 mm),接入10 mL N6培养基中,26℃,100 r/min振荡暗培养。每周换3次培养基。

(2) 培养2~3周后,选取分散相较好的细胞块继代培养,每周2次。

(3) 培养2~3个月后,建立起悬浮细胞系。良好悬浮细胞系的特点:

① 细胞总体积每周增加1倍。

② 细胞呈乳白色,无分化特征。

③ 细胞块细小,分散度高(直径小于1 mm)。

4. 原生质体的分离与纯化

(1) 取1~1.5 g除去培养液的悬浮细胞,放入10 cm培养皿中,加入10~15 mL酶液,石蜡膜封口,25℃,黑暗,20 r/min振荡酶解4 h。

(2) 200目滤网过滤,500 r/min离心5 min,收集原生质体。

(3) CPW-9M离心洗涤两次,原生质体沉淀重新悬浮在2 mL CPW-9M中。

(4) 在10 mL离心管中加入8 mL CPW-21S,再在此液面上缓缓加入上述2 mL原生质体悬液,600 r/min离心5 min。

(5) 小心吸出溶液界面间的原生质体,用CPW-9M离心洗涤一次,用KPR培养基洗涤一次,得到纯净的原生质体。

5. 原生质体培养

(1) 纯化的原生质体悬浮于KPR培养基中,接种密度为5×10^4个/mL,25℃,暗培养。

(2) 培养2~3周后,将生成的小愈伤转移到愈伤生长的固体培养基上,培养。

(3) 待愈伤长至1.5~2 mm时,转入分化培养基中,诱导不定芽。

(4) 不定芽长至2~3 cm时,从基部切下插入生根培养基,获得再生植株。

（三）柑橘原生质体培养

1. 胚性愈伤组织的诱导

取花后 2～6周的珠心组织，接种在 MT（Murashige和 Tucker，1969）附加 500 mg/L麦芽浸出物的培养基上，诱导愈伤组织。愈伤组织转入新鲜培养基后 20 d，取新长出的部分进行原生质体分离。

2. 原生质体的分离

取约 0.8 g胚性愈伤组织置于 10 mL酶液中。酶液组成为 0.3%果胶酶 +0.3%纤维素酶 +0.1 mol/L蔗糖 +0.56 mol/L甘露醇 +MT大量元素 +0.5 mmol/L MES，pH5.7，28℃黑暗中酶解 16 h。

3. 原生质体纯化

酶解液经 30 μm孔径的筛网过滤，去掉碎片，100 g离心 6 min，回收原生质体沉淀，沉淀用原生质体培养基 MT+0.65 mol/L蔗糖洗涤 2次，用培养基悬浮至 5×10^4～1×10^5 个原生质体 /mL备用。

4. 原生质体的培养

在直径为 6 cm的培养皿中，加入 1.5～2.0 mL悬浮好的原生质体，石蜡带封口，于 28℃培养。培养 2周左右，原生质体再生细胞分裂形成小细胞团时，加入 4～5滴新鲜培养基（0.45 mol/L蔗糖），降低渗透压约 20%，随后再降 2次。培养 1个月左右，细胞团分裂到肉眼可见大时，转入三角瓶中悬浮培养（100 r/min）。细胞团形成球形胚状体时，培养基中加入 5 mg/L硫酸腺嘌呤，使胚状体转绿和进一步分化。子叶期胚状体转入加有 3 mg/L赤霉素的 MT固体培养基中，胚状体萌发成为完整植株。

三、作业思考题

1. 比较植物原生质体培养与一般组织和器官离体培养的异同。
2. 简述植物原生质体培养获得再生植株的主要步骤。

（刘凤珍）

实验 10　植物辐射诱变技术

辐射育种就是利用各种物理射线（如 γ射线、X射线、β粒子、中子、质子、紫外线和激光）照射植物的种子、花粉、子房、合子、营养器官等，使其遗传物质发生变异，再经过筛选优良的变异而培育优良品种的方法。辐射育种不仅能扩大变异范围，提高性状突变频率，而且具有变异稳定快，育种年限短的特点。辐射处理有助于打破有利基因与不利基因的连锁，实现基因的重新组合；辐射也可改变植物育性，促进远缘杂交的成功。因此，辐射育种也常与杂交育种、远缘杂交育种、杂种优势利用等途径相结合，提高育种效率。

实验目的是通过观察，初步了解和掌握植物辐射育种方法、特点和效果。

一、试材及用具

1. 试材

相关植物材料。

2. 用具

钴（^{60}Co）源等设施、辐射育种试验地、田间种植计划书、米尺、铅笔及记录本等。

二、内容说明

出于射线来源、设备条件和安全等因素的考虑，目前辐射育种常应用强 γ射线进行照射，以^{60}Co辐射源最为常用。这类实验室的放射源被封闭在一定的容器中，工作人员并不直接接触放射源而是利用放射源发出的 γ射线进行工作，所以实验室的设计主要着眼于外照射的防护上。要严格实验技术操作规程，保证实验人员和工作人员健康和安全。

辐射诱变材料的选择包括选择亲本和选用哪种器官或组织用于辐射处理。由于辐射诱变大多是单个基因位点的突变，因此它最适于改变植物品种的个别缺陷（如晚熟，感染某种病害等），而不致损害或改变该品种的其他特性。通常选择在当地适应性强，具有优良的综合性状，但有一二个缺点的品种或有希望，有苗头的高世代品系，通过诱变和选择以获得缺点有改进的优良新品种。供试材料的品种类型可以是自交植物或常异交植物的纯系品种，无性繁殖植物的营养系品种，也可以是异交植物杂交种品种的自交系亲本等。常用于辐射诱变的植物材料有以下类型。

1. 干种子

干种子是辐射育种最常用的处理材料，它运输、处理方便，并适于大量处理。

2. 萌动种子

萌动种子对辐射处理的敏感性比干种子强。种子萌动时，各个胚细胞第一次分裂步调比较一致，可以在诱发突变最有效的细胞分裂时期处理，提高诱变效率。

3. 绿色植株

可将植物种植或移栽到设有照射装置的场所（如钴植物园）进行辐射处理。如采用盆栽将更为方便，能有效掌握辐射剂量，可在不同生育阶段照射，也可多次间歇性照射。

4. 营养器官

无性繁殖植物在辐射诱变时多以营养器官或营养器官的一部分进行处理，其优点是一旦发生了有益突变，即可用营养繁殖将其固定下来，育成新的突变系。诱变材料类型因植物种类而异，如大田作物地瓜的块根，蔬菜作物中的山药块根、马铃薯块茎、蒜鳞茎，观赏植物中莲花根茎、君子兰鳞茎，多种果树的扦插枝条、嫁接接穗等。无性繁殖植物的诱发变异常以突变嵌合体的形式表现出来，可采用重复营养繁殖法、组织培养法等分离筛选出优良的同型突变体。

5. 花粉、子房

花粉照射后，授以特定母本的柱头产生杂种后代，并对后代进行多代自交分离，选出符合要求的变异类型。同理也可以进行雌性器官的子房照射，辐射处理子房不仅能诱发卵细胞突变，而且可以诱发孤雌生殖。子房照射前先进行人工去雄，辐射后授以正常花粉。照射花粉、卵细胞的最大优点是不产生嵌合体。

6. 其他

用于诱变处理的试验材料还有幼茎、幼叶、胚状体、胚、愈伤组织、游离单细胞及原生质体等。试材经辐射处理后再进行培养基接种培养获得突变再生株。辐射诱变与离体培养技术相结合的育种方法日益受到重视，其中的一个重要原因是为了避免或限制突变嵌合体的形成。如照射单倍体细胞诱发的突变，不论是显性突变还是隐性突变都能在细胞水平或个体水平上表现出来，突变的单倍体经人工或自然加倍即可得到二倍体纯系，有利于突变体的选择，并能加速育种进程。

辐射育种 M_1 代由于生理损伤和存在嵌合体等原因，一般不进行选株，但对杂种 F_2 代或单倍体的群体进行诱变处理时，M_1 代就会出现性状分离，也可以进行选择；M_2 代是诱变处理后性状分离最大的世代，可遗传的变异一般都能表现出来，因此，在生育期内应进行仔细的观察和比较，力求发现和选拔出综合性状好，具有经济价值的突变体；在 M_3 和 M_4 代，要选择优良稳定的株系，淘汰综合性状不好的株系，对仍有分离的株系继续进行优良单株的选择，直至性状稳定为止。一般从 M_3 代开始，对已稳定的株系就可提升参加下年度的品系产量比较试验。

三、方法步骤

在教师或有关技术人员讲解和引导下，进行以下观察、分析。

（一）参观钴源和利用 γ 射线辐射处理种子的方法

教师介绍钴源设施并演示钴源辐射操作系统。

取禾谷类植物（如小麦）干种子 10份，分别以 1万伦琴、1.5万伦琴、2万伦琴、2.5万伦琴和3万伦琴的剂量照射，每种剂量重复处理两次。

（二）观察

观察各辐射诱变世代（M_1 ～M_5）的种植方式、密度、群体大小和对照品种行（区）的设置情况。

（三）观察并分析辐射后代的表现

以小麦纯系品种干种子辐射后代为例。

1. M_1 代辐射效应

⑴ 致死效应

包括发芽率、出苗率及成株率等方面的变异。

⑵ 生理效应

包括分蘖力、生长势、株高、叶色、育性、结实率及成熟期等方面的变异。

⑶ 形态异常效应

包括叶序混乱、旗叶和穗下节间扭曲、双穗、畸形穗等方面的变异。

以上变异多属于因辐射而造成的生理性损伤，一般是不能够遗传的。有些 M_1 植株因部分组织或器官发生变异而表现为嵌合体。诱发的突变大多数为隐性突变，在 M_1 代一般不能显露，但显性突变的性状能够表现。如果辐射处理单倍体（花粉、卵细胞或单倍体植株），不论是隐性突变还是显性突变，M_1 代植株均可表现出来。

2. 观察 M_2 代性状的分离特点及辐射损伤的恢复情况

M_2 代是突变显现最多的世代。有大突变和微突变，绝大多数突变是不利的（如常见的叶绿素突变），同时也可能出现早熟、矮秆、抗病、抗逆及优质等有益突变。

3. 观察 M_3 代和 M_4 代

观察被改良的性状和其他有益突变性状的稳定情况。

（四）观察微突变

观察微突变在各世代的表现及随世代增加的积累情况。

（五）比较效果

观察比较不同辐射诱变因素（$^{60}Co\gamma$ 射线、激光、快中子等）、不同剂量的处理效果。

四、作业思考题

1. 概括总结某一植物辐射育种程序中各世代的种植方式、表现特点和主要工作内容。
2. 根据辐射后代材料的遗传变异特点，你认为进行植物辐射育种时应注意什么问题？
3. 辐射后代与品种间杂交的后代在表现特点上有哪些不同？分析说明其原因。

（李宪彬）

实验 11　植物化学诱变技术

化学诱变育种是人工利用化学诱变剂诱发植物发生突变，再通过多世代对突变体进行鉴定和选择，直接或间接地培育成植物新品种的方法。与物理诱变相比，化学诱变具有成本低，使用方便，诱变作用专一性强，对处理材料损伤轻等特点，是一种迅速发展的育种途径。

实验目的是通过本实验操作，初步掌握化学诱变处理方法，并对化学诱变生理损伤效应、诱变后代性状变异等进行分析鉴定。

一、试材及用具

1. 试材

玉米自交系种子。

2. 用具

镊子、培养皿、滤纸、烧杯、三角瓶、量筒及发芽箱等。

3. 试剂

磷酸二氢钠、磷酸氢二钠、甲基磺酸乙酯及蒸馏水等。

二、内容说明

烷化剂是诱发栽培植物突变最重要的一类化学诱变剂，包括烷基磺酸盐、烷基硫酸盐、亚硝基烷基化合物、环氧乙烷和次乙亚胺类、芥子气类等。烷化剂都带有一个或多个活泼烷基，对生物系统的作用重点是 DNA 和 RNA，与 DNA 反应时，烷基置换碱基多个位置上的氢原子，被称为烷化作用。已确定烷化作用最容易在鸟嘌呤碱基 N_7 位置上发生，反应先形成不稳定的膦酸酯，从而发生两种遗传效应：胸腺嘧啶与烷化的鸟嘌呤配对，代替胞嘧啶，发生转换型的突变；由于鸟嘌呤的 N_7 位置烷基活化，糖苷键断裂造成脱嘌呤，脱去鸟嘌呤的 DNA 分子在进一步复制时，原来鸟嘌呤的位置成了一个空位，其互补位置上的碱基就不受严格的配对限制，4 种碱基都有机会进入，从而造成转换、颠换等。此外，还可能发生糖—磷酸骨架断裂，造成染色体缺失。代表性烷化剂如甲基磺酸乙酯（EMS）诱变效应可用“两高一广”来评价，即频率高，效率高和范围广。与其他诱变剂相比，EMS 诱变后产生的突变频率高，尤其是显性突变频率高，易于突变体的筛选，目前已成为在植物诱变育种中应用最广泛，效果最好的一种化学诱变剂。

另一类化学诱变剂具有与 DNA 碱基类似的结构，如 5—溴尿嘧啶（5—BU）、5—溴脱氧尿嘧啶核苷（5—BUdR）、2—氨基嘌呤（AP）及马来酰肼（MH）。这些碱基类似物的作用机制与烷化剂明显不同，它们因化学结构上与 4 种 DNA 碱基（A，C，G，T）的一种相似，可以在 DNA 复制过程

中，冒充正常碱基掺入到复制后的 DNA链中，进而导致碱基配对差错，引起点突变。由于这类诱变剂引发的生物学效应与辐射诱变相似，因此又被称为“拟辐射物质”。

报道的其他药剂类型很多，如叠氮化钠（NaN_3）、平阳霉素（PYM）、羟胺（NH_2OH）、重氮甲烷、秋水仙素、双氧水（H_2O_2）及丝裂霉素 C等物质，均能影响 DNA合成和分解的有序性，导致染色体畸变和基因突变。

绝大多数化学诱变剂都有极强烈的毒性，或易燃易爆。如烷化剂中大部分属于致癌物质，芥子气易造成皮肤溃烂，乙烯亚胺有强烈的腐蚀作用而且易燃，亚硝基甲基脲易爆炸等。因此操作时必须注意安全，避免药剂触及皮肤，误入口内或熏蒸的气体进入呼吸道。同时，要妥善处理残液，避免造成污染。

不同化学诱变剂处理的适用条件、方法、效果等不尽相同，本实验练习甲基磺酸乙酯（EMS）处理玉米或其他植物种子的实验方法。

三、方法步骤

（一）药剂配制

诱变处理时通常先将药剂配制成一定浓度的溶液。甲基磺酸乙酯在水中很不稳定，水解后发生变性，产生不具诱变作用的酸性有毒化合物，从而会显著提高植物的生理损伤，降低 M_1 植株存活率。因此，配制好的药剂不宜贮存，诱变时应使用新配制的溶液。使用一定 pH的磷酸缓冲液，可显著提高诱变剂在溶液中的稳定性，缓冲液的磷酸盐浓度一般不应超过 0.1 mol/L。

1. 0.01 mol/L pH7磷酸缓冲液配制

A液（0.01 mol/L磷酸二氢钠）

取 1.38 g $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$，定容至 1 000 mL；

B液（0.01 mol/L磷酸氢二钠）

取 2.683 g $Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$或 3.585 g $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$，定容至 1 000 mL；

取 A液 390 mL，B液 610 mL，即得 1 000 mL 0.01 mol/L磷酸缓冲液（pH7）。

2. 不同浓度 EMS溶液配制

EMS为无色液体，根据其相对密度（纯净时 d＝1.203）分别配制 0.1%、0.2%、0.3%、0.4%、0.5%质量浓度的水溶液。配制时用 0.01 mol/L磷酸缓冲液（pH7）稀释定容，充分混匀，低温（0～10 ℃）避光放置待用。

（二）试材预处理

用化学诱变剂处理前，玉米干种子经粒选后用蒸馏水预浸 12 h（20 ℃），从种子中析出萌芽抑制物和游离代谢物等水溶性物质，使细胞代谢活跃，提高种子对诱变剂的敏感性。浸泡还可提高细胞膜透性，加快种子对诱变剂的吸收速度。实践证明，当细胞处于 DNA合成期（S）时，对诱变剂最敏感。所以，浸泡时间的长短取决于材料到达 S期所需的时间，可通过采用同一种诱变剂处理不同浸泡时间的种子的方法来确定。一般诱变剂处理应在 S期稍前阶段进行。

（三）药剂处理

用吸水纸吸去种子表面水分，分为 6个处理，即分别浸入 0（对照，浸入不含 EMS的磷酸缓冲液中）、0.1%、0.2%、0.3%、0.4%、0.5%质量浓度 EMS溶液中，处理时间 8 h。每个处理 50粒，种子与药液的比例为 1粒 /mL，重复 3次。

温度对诱变剂 EMS的水解速度有很大影响，在低温下诱变剂能保持一定的稳定性，从而能与被处理材料发生作用。但另一方面，当温度增高时，可提高诱变剂在材料体内的反应速度和作用能力。因此，适宜的处理方式应先在低温（0～10 ℃）下把种子浸泡于诱变剂中足够的时间（如 4 h），使诱变剂进入胚细胞中，然后转移至室温或更高温度（小于 40 ℃）下进行处理，以提高诱变剂的反应速度。

（四）药剂处理后的漂洗、播种

经药剂处理后的材料必须用清水进行反复冲洗使药剂残留量尽可能地降低，以中止药剂处理作用，避免增加生理损伤。一般流水冲洗约需 1 h甚至更长时间。经漂洗后的材料应立即播种，有些不能立即播种而需暂时贮藏的种子，应贮藏在 0 ℃左右的低温条件下。

（五）考察诱变早期世代（M_1、M_2 代）的生理损伤和突变率

M_1 代单粒播种，套袋自交，单穗分别收获，M_2 代种成穗行。以出苗率、成活率、畸变率反映植株生理损伤程度，畸变率即 M_1 或 M_2 代具有畸变性状植株的比例，畸变性状可选择易于鉴别的质量性状，主要包括雄穗畸变如雄性不育，雄花结实，雄穗无分枝，无雄穗等，叶形畸变如叶片皱缩变厚不能伸展，叶色畸变如叶片上有黄色、白色条纹或黄色斑块等。M_2 代性状突变率以突变穗行百分率计，将出现一个至多个突变个体或全部为突变个体的穗行定为突变穗行。

四、作业思考题

1. 甲基磺酸乙酯化学诱变剂的作用机制是什么？为提高诱变效果，在应用中应注意哪些问题？

2. 将实验结果分别填入表 2－4和表 2－5。从“减少生理损伤，提高突变频率”角度分析确定甲基磺酸乙酯处理玉米自交系种子的适宜质量浓度。

表 2－4　甲基磺酸乙酯不同质量浓度对 M_1、M_2 代出苗率、成活率、畸变率的影响

世代	处理质量浓度 /%	出苗率	成活率	畸变率
M_1 代	CK 0. 1 0. 2 0. 3 0. 4 0. 5			
M_2 代	CK 0. 1 0. 2 0. 3 0. 4 0. 5			

表 2－5　M_2 代主要性状突变频率

性状	处理质量浓度 /%	性状变异范围	正突变 /%	负突变 /%
株高 /cm	CK 0.1 0.2 0.3 0.4 0.5			
穗位高 /cm	CK 0.1 0.2 0.3 0.4 0.5			
穗位叶长 /cm	CK 0.1 0.2 0.3 0.4 0.5			
穗位叶宽 /cm	CK 0.1 0.2 0.3 0.4 0.5			
穗行数	CK 0.1 0.2 0.3 0.4 0.5			
千粒重 /g	CK 0.1 0.2 0.3 0.4 0.5			

（李宪彬）

实验 12　植物多倍体诱导与鉴定技术

通常植物细胞染色体自然加倍的频率是很低的，很难满足多倍体育种的要求。所以必须利用染色体人工加倍的方法诱导获得植物多倍体。

实验目的是练习用秋水仙素人工诱导植物多倍体的几种方法，掌握间接和直接鉴定多倍体的技术。

一、试材及用具

1. 试材

小麦（2n＝6X）、小黑麦（2n＝8X）、玉米（2n＝2X，2n＝4X）、西瓜（2n＝2X，2n＝3X，2n＝4X）及大蒜（2n＝2X，2n＝4X）等根尖压片标本。

2. 用具

带测微尺显微镜、刀片、镊子、培养皿、烧杯、载玻片、盖玻片、纱布、酒精灯、量筒及发芽箱等。

3. 试剂

秋水仙素、二甲基亚砜、酒精、浓盐酸、醋酸洋红染色液、升汞及蒸馏水等。

二、内容说明

染色体人工加倍的方法一般是利用物理因素或化学因素处理。物理因素包括温度剧变，机械创伤，电离或非电离射线照射，离心等。这些因素虽能诱导染色体加倍，但频率较低，其中物理射线诱导染色体加倍的同时也易引起基因突变，应用效果不够理想。诱导植物多倍体常用的化学因素有秋水仙素、萘嵌戊烷、吲哚乙酸、三氯乙醛、一氧化二氮（N_2O）和富民农等。但到目前为止，应用最广泛，最有效的方法是利用秋水仙素处理。秋水仙素（$C_{22}H_{25}O_6N$）是从百合科植物秋水仙（Colchicum autumnale）器官和种子中提取的一种植物碱，一般呈淡黄色粉末（高纯度时无色），晶体针状，易溶于冷水、酒精、乙醚、氯仿或甲醛，在热水中反而不易溶解。

秋水仙素与正在分裂的细胞接触后，能抑制细胞微管的聚合，使纺锤丝的形成受到抑制或不能形成，染色体不能排列在赤道板上。由此使细胞停顿在分裂中期，染色体虽能复制，但不能分向两极，造成染色体数目加倍而成多倍体。在一定时期内，经冲洗后的细胞仍可恢复常态，继续分裂，只是细胞核内的染色体数目已经加倍，成为多倍性的细胞，在遗传上很少发生其他不利的变异。有时在处理初期的植株上出现茎、叶的短期变态，但以后除与多倍性相应的性状变异外，变态均能自行消失。较之其他化学因素，应用秋水仙素的优势还在于它适于处理的植物的器官或组织的类型多，对于干燥的种子、正在分裂的幼芽或根茎组织，以及花芽、花粉粒和卵细胞等，都能发生作用。

依据秋水仙素诱导植物多倍体的原理和经验，总结以下几个技术原则供实验时参考：

1. 秋水仙素分子通过水溶液或其他制剂可以渗透到植物组织内部，促使分生组织内部发生变化。但是处理休眠组织常不能发生应有的作用，诱导效果差。

2. 不同植物、同一植物的不同器官或组织、不同生育阶段对秋水仙素的反应不同，有的敏感，有的迟钝。如幼根、较嫩茎反应敏感，处理幼根较易造成药害。在诱导多倍体时，应选取一个

适宜的浓度（范围），如果浓度太大，就会引起植物死亡；浓度太小，往往又不致发生应有的作用。

3. 对植物器官、组织或细胞处理的时间长短，一般取决于细胞的分裂周期。对分裂快的组织细胞，处理时间宜短，溶液浓度宜低；反之，处理时间可长些，溶液浓度宜高。而且，对同一材料而言，在一定有效浓度范围内，处理浓度愈高，时间则愈短，浓度高而处理时间短的，其效果往往好于浓度低而处理时间长的。

4. 处理时应针对植物材料的特点，提供和保持有利于细胞分裂的最适宜的外界条件。其中温度条件为重要的影响因素，在一定范围内，较高的温度诱导成功的可能性较大。

综合上述，须根据具体情况把握处理的浓度、处理温度和持续时间，因此，在处理前最好先做几组不同浓度和持续时间的预备实验。

5. 实验操作谨慎细心，注意安全防护，避免或减轻环境污染。秋水仙素属剧毒药品，在操作使用时要严格注意安全，既不要让它的粉末在空中飞扬，以免误入呼吸道，也不可与眼、口、鼻、皮肤等接触，避免发生危险。

利用秋水仙素进行染色体加倍时，一般将其配成一定浓度的水溶液、酒精溶液或甘油溶液，也可配制成羊毛脂膏、凡士林或琼脂等制剂。处理使用方法有浸渍法、滴液法等多种。

三、方法步骤

（一）秋水仙素制剂的配制

1. 水溶液

可将秋水仙素直接溶于冷水中或先以少量酒精为溶媒，然后再加冷蒸馏水，先配成 1% 的高质量分数母液，用时再根据需要将母液稀释至所需浓度。配制母液的目的是为了便于存放和节约使用，母液或已稀释的溶液放于棕色瓶中，并盖紧以减少与空气的接触，置于暗处。处理时也要避免强光照射，以免改变药性，降低药效。使用过的溶液经过滤仍可应用，但浓度已改变。秋水仙素水溶液在 0.01% ～1% 的质量分数范围内使用都有效果，常用质量分数范围为 0.02% ～0.5%。

二甲基亚砜（dimethyl sulphoxide，DMSO）是一种有效的载体剂，能促进秋水仙素渗透到植物组织中，一般采用质量浓度为 1% ～3% 的二甲基亚砜与一定浓度的秋水仙素混合制成水溶液来应用，可增强染色体加倍的诱导效果。

2. 羊毛脂软膏

可将秋水仙素粉末（如为结晶，须先研成细粉末）直接加入精制羊毛脂（为淡黄色软膏，熔点 40 ℃，不溶于水）中并搅拌均匀，也可把一定量的精制羊毛脂放入小研钵中，然后将质量分数为 0.01% ～0.05%（按所需浓度配制）的秋水仙素溶液少量徐徐地加入并充分混合。

3. 混合乳剂

可取硬脂酸 1.5 g 羊毛脂 8 g　1，4—氧氮陆圜（C_4H_9ON）0.53 mL，加水 20 mL，并加热融化配成乳酪状态。然后在用时加入秋水仙素溶液，兑水稀释至需要浓度。还可用甘油 7.5 mL，水 2.5 mL，10% Santomerse（湿润剂）6～8 滴配成混合液，用时加入秋水仙素溶液并稀释至最终浓度。

（二）利用秋水仙素加倍染色体

1. 浸渍法

处理种子、插条、接穗、禾本科幼苗及双子叶植物幼苗的茎端生长点可用此法。

农作物的种子常用干种子进行直接处理。如麦类可将干种子先放在 0.1%升汞溶液中消毒 10 min,接着 (不必用水冲洗)放入 0.1%秋水仙素溶液中浸种 24 h,用清水冲洗数次 (最好用流水冲洗干净)后,一部分播种于土壤中使其发芽,另一部分种子用于直接观察根尖染色体数目。棉花种子则先用浓硫酸浸渍脱绒,冲洗后放入 0.1% ～0.15%秋水仙素溶液中浸种 16 h,仍以清水冲洗后播种。除处理干种子外,也可将植物种子浸入水中使其萌动,再注入一定浓度的秋水仙素溶液,加盖避光,置于发芽箱保持适宜发芽温度 (一般 20～25 ℃),处理时间数小时至 3天。处理中适当遮盖,不使种子见光并保持其湿润,每天加入适量的稀释一倍或原浓度的秋水仙素溶液,但不要淹没种子。处理后用清水冲洗数次,然后播于土壤或砂培。

种子处理的缺点在于秋水仙素处理后根部易受药害,阻碍以后的根系发育,尤其在处理双子叶植物幼苗时药害较为严重,而只处理茎生长点可以避免这一点。处理双子叶植物幼苗时,可将嫩茎生长点处割裂一小口,倒置或横插于盛有药剂的器皿中,让茎端的生长点浸入 0.03% ～0.05%秋水仙素溶液中,棉花处理时间 24 h左右。对于禾谷类植物,也可采用类似的方法,在玉米、高粱等作物幼苗长出 3～5片真叶,麦类、水稻 2～3个分蘖时,将幼苗挖出,根部用清水冲洗后以湿布遮盖以免干燥。用小刀在茎生长点处切一深至 2～3个叶鞘的伤口,如幼苗有几个较大的分蘖,在每一分蘖上均需切一伤口,以增加秋水仙素溶液与茎生长点的接触机会。将幼苗倒置,使茎尖浸入 0.03% ～0.05%秋水仙素溶液中处理 3～4 d (水稻 8～14 d),处理时室温不超过 20 ℃。处理苗株的容器要放在室内光线不太强烈的地方,并在容器上标出溶液的水平面,以便每天加注秋水仙素溶液补充蒸腾和蒸发散失的水分,尽量保持其浓度不变。处理完毕,将幼苗取出用清水冲洗数次,栽植于盆钵中,浇足水分,保持室内温度不超过 10 ℃,让幼苗缓慢恢复生机。对于小麦、黑麦等作物也可将冲洗干净的整个根系浸入秋水仙素水溶液中处理 2～5 d,最后用水冲洗后移栽。

对于用根繁殖或用插条繁殖的植物,可将幼根分生组织或幼嫩枝条浸入秋水仙素溶液处理 1～2 d,再用清水充分冲洗。大蒜、百合等以鳞茎繁殖的植物,只将其根部接触药液,于 25 ℃条件下培养 3～5 d,当幼根长 0.5～1 cm时取材固定,压片镜检,相应幼株栽植于土壤。

2. 滴液法

对长大的草本植物或木本植物的顶芽、腋芽生长点的处理多采用此法。常用的秋水仙素水溶液质量分数是 0.1% ～0.4%,每日滴一至数次,反复处理数日,使溶液透过表皮渗入组织。为避免处理液损失,可用小片脱脂棉包裹幼芽,将药液滴在脱脂棉上,这种方法能够在较长时间内保持脱脂棉湿润,有利于药液向分生组织渗入。滴液法能避免或减轻药剂对根系和茎叶的影响,一般不致引起处理植株的死亡,而且还可随时观察处理过程中的反应情况,及时决定增加或减少处理次数和处理浓度。

3. 涂抹法

把配好的羊毛脂软膏用小毛刷均匀涂布在幼苗或枝条顶端,根据需要可反复涂抹数次。适当遮盖处理部位,以减少蒸发并避免雨水冲刷。

4. 注射法

对于小麦等小粒禾谷类植物适于此法。用注射器把秋水仙素水溶液注射到幼株分蘖的生长点上方,诱使生长点细胞染色体加倍。

5. 喷雾法

用喷雾器将配制好的秋水仙素乳剂喷到要处理的顶芽、腋芽或其他部位。每日数次，连续数日，喷时及喷后须注意遮蔽日光（如考虑在室内进行），避免药剂很快蒸发散失。如果乳剂中有甘油，应在处理后几小时或一日内把甘油冲洗掉。

6. 药剂—培养基法

把稀释的秋水仙素水溶液（如 0.01%）加入琼脂培养基中，把幼胚在培养基上培养 2～4 d，然后把萌动胚用清水漂洗干净，再移植到不含秋水仙素的培养基上继续培养成幼苗，最后移栽至土壤中。这种方法最适合处理远缘杂交后因胚乳不发育或发育不良由种子剥离下的幼胚。实施胚抢救的同时，通过秋水仙素诱导幼胚萌动过程中的幼芽和幼根细胞染色体加倍。

（三）植物多倍体的鉴定

需要对秋水仙素处理后的植物材料进行鉴定，才能明确植物染色体加倍是否成功。植物多倍体的间接鉴定是根据植物的育性、形态特征等进行初步的间接判定，鉴定方法视鉴定对象是异源多倍体还是同源多倍体略有不同。异源多倍体一般较易鉴定，加倍当代植株的全部或部分花药即可正常散粉结实，育性得到恢复，所以检查处理材料的育性变化是鉴定异源多倍体的可靠标志。如处理成功的小黑麦杂种第一代，其一部分小穗在开花时就会出现饱满的花药并散出花粉，表现部分可育性。此类植株的种子下年长成的植株几乎都是加倍了的异源六倍体或异源八倍体小黑麦。同源多倍体在植株形态上多呈巨大型，可通过观察叶片是否变肥厚，叶形有无变化，气孔、保卫细胞及花粉粒是否变大，茎是否变粗等进行鉴定。一般最明显的变化是花器和种子显著变大，但结实率往往下降。如果出现这类植株，可初步判断为染色体加倍成功。连续 2～3代的鉴定是必要的，如植株形态、花器大小、生育期等的确与原始供体大不相同，所结种子明显增大，更有把握判定已加倍成功。

当然，最可靠还是直接鉴定的结果。直接鉴定就是检查花粉母细胞或根尖细胞内染色体数目。凡染色体数比原始数目增加一倍的即为多倍体。染色体标本制片方法多采用常规压片法（参见实验 45）。

四、作业思考题

1. 简述利用秋水仙素诱导植物多倍体的原理和方法，领会并补充利用秋水仙素诱导植物多倍体的技术原则。

2. 自己实际操作并利用实验提供标本，测定并记录植物多倍体鉴定结果（表 2－6）。

表 2－6　植物多倍体鉴定记载表

植物类型	染色体倍性	保卫细胞大小		气孔数 /（个 /mm^2）	染色体数目
		长 /μm	宽 /μm		
玉米	二倍体 四倍体				
大蒜	二倍体 四倍体				
西瓜	二倍体 四倍体				

（李宪彬）

实验 13　根癌农杆菌介导的植物基因转化技术

根癌农杆菌（Agrobacterium tumefaciens）是一种能诱发植物产生肿瘤的细菌，根癌农杆菌中诱导植物产生肿瘤的质粒（tumor inducing plasmid），简称为 Ti质粒。野生型农杆菌的 Ti质粒，含有两个与致瘤有关的区域：一个是 T－DNA区（transferred DNA region），含致瘤基因；另一个是毒性区（virulence region），在 T－DNA的切割、转移与整合过程中起作用。用于植物基因转化的农杆菌 Ti质粒载体系统的构建，是将野生 Ti质粒中的致瘤基因删除，并在 T－DNA区域内插入适当的选择标记和多克隆位点。图 2－1是植物表达载体 pBI121的 DNA图谱，以 CaMV35S启动子驱动的新霉素磷酸转移酶基因 NPT－Ⅱ为卡那霉素抗性选择标记基因，以 β－葡萄糖苷酸酶（β－glucuronidase，GUS）基因为报告基因，经 pBI121转化获得的转基因细胞、组织或植株，具有抗卡那霉素的特性，经组织化学染色呈蓝色。

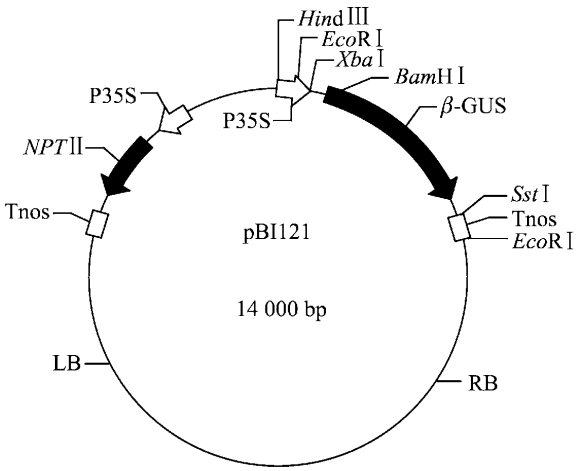


图 2－1　Ti质粒载体 pBI121图谱

实验目的是掌握根癌农杆菌侵染植物获取转基因材料的方法，理解农杆菌介导途径进行基因转化的机制，了解转基因植物筛选的方法。

一、试材及用具

1. 试材

烟草无菌苗、农杆菌 LBA4404及质粒 pBI121。

2. 用具

超净工作台、高压灭菌锅、小型离心机、光照培养箱或培养室及恒温摇床等。

二、方法步骤

（一）试剂的配制

1. YEB培养基

牛肉膏 (5 g/L),酵母抽提物 (1 g/L),蛋白胨 (5 g/L),蔗糖 (5 g/L),$MgSO_4$ (2 mmol/L),pH7.2。固体培养基含琼脂 15 g/L。

2. 烟草分化培养基

MS+2 mg/L 6-BA + 0.5 mg/L IAA。

3. 烟草生根培养基

MS+0.5 mg/L IAA。

4. 卡那霉素 (KAN)母液

100 mg/mL,过滤除菌,分装,-20 ℃保存。

5. 羧苄青霉素 (CB)母液

50 mg/mL,过滤除菌,分装,-20 ℃保存。

6. 链霉素 (SM)母液

100 mg/mL,过滤除菌,-20 ℃保存。

7. X-gluc(5-溴-4-氯-3-吲哚-β-葡萄糖醛酸苷)溶液 (1 mL)

称取 0.5 mg X-gluc,加入 1～2 滴 N,N-二甲酰胺 (DMFA)使之完全溶解,再加入 980 μL 磷酸缓冲液 (0.1 mol/L, pH7.0)、10 μL铁氰化钾 (5 mmol/L)、10 μL亚铁氰化钾 (5 mmol/L),搅拌混匀后加入 1 μL Triton X-100。X-gluc溶液应现用现配。

(二)农杆菌培养

1. 挑取携带植物表达载体质粒的农杆菌单菌落,接种在 20 mL含 100 mg/L SM和 50 mg/L KAN的 YEB液体培养基中,28 ℃,180 r/min振荡培养过夜。

2. 活化过夜的农杆菌按 1∶50的比例接种在相同的 YEB液体培养基中,继续培养至对数生长期。

3. 5 000 r/min离心 5 min,收集菌体,用 1/2MS液体培养基悬浮至 OD_{600}=0.2～0.5,准备感染用。

(三)外植体的浸染及共培养

1. 取烟草无菌叶片,切成 4～6 mm的叶盘 (或用打孔器制取),叶盘外植体浸入农杆菌菌液中,感染 10～20 min,取出外植体用无菌滤纸吸去附着的菌液。

2. 将浸染过的外植体接种在烟草分化培养基上,暗培养 2 d。

(四)选择培养

将共培养的外植体转移到含 500 mg/L CB和 100 mg/L KAN的烟草分化培养基上,25 ℃,光照培养。

(五)继代培养

每隔 2～3 周继代一次,并逐渐降低 CB的浓度至 200 mg/L。

(六)生根培养

待培养筛选的抗性芽长至 1～1.5 cm时,切下并转入含有 200 mg/L CB和 75 mg/L KAN的烟草生根培养基上诱导生根,获得具有卡那霉素抗性的转基因植株。

(七)转基因植株的 GUS基因检测

1. 从具有卡那霉素抗性的烟草植株上,剪取幼嫩叶片,放入 0.25 mL的小离心管中,加入适量的 X-gluc溶液,叶片全部浸泡在染液中,盖好盖子防止挥发。

2. 37 ℃保温,染色 2 h可看到蓝色,染色过夜。

3. 依次用 70%、80%、90%和 100%的乙醇脱色,直至绿色褪去。

4. 观察转基因植株叶片与未转化植株叶片的颜色。

三、作业思考题

1. 简述农杆菌介导途径进行基因转化的机制及操作步骤。
2. 根据实验结果，分析影响基因转化效率的因素。

（刘凤珍）

实验 14　植物航天诱变技术

植物航天育种是利用卫星、飞船等返回式航天器将植物的种子、植株、组织、器官等搭载到宇宙空间，在距离地球 20～40 km强辐射、微重力等太空诱变因子作用下，促进生长点分裂细胞内的基因重组，使其发生遗传性状变异，利用有益变异选育出植物新品种的育种技术。与物理诱变相比，虽然其性状突变的不定向性依然存在，但能完全避免环境污染，且研究成本低，育种成效快。航天育种具有突变频率高，突变谱广，有益可遗传变异多，育种周期短等特点，是选育高产、优质、早熟、抗病植物新品种和有特色种质资源的新途径，是 21世纪前景诱人的农业高新技术。

本实验以飞船搭载水稻纯系品种的干种子为试材，观察航天育种程序，初步了解和掌握航天育种方法，对航天育种早代材料的性状变异进行分析鉴定。

一、试材及用具

1. 试材

航天搭载处理后的植物种子。

2. 用具

水稻或其他植物航天育种试验地、田间种植计划书、米尺、铅笔及记录本等，烧杯、镊子、细砂、蒸馏水、标签纸、发芽盒、发芽箱及温度计等。

二、内容说明

空间条件能引发许多植物性状的遗传变异，空间的诸多因子影响植物的生存、生长、发育、衰老等，高真空、微重力、强辐射、超净环境、高能粒子辐射、宇宙射线、强紫外线照射和交变磁场等都可能引起植物染色体的损伤及对损伤后的恢复产生影响，最终导致染色体畸变和基因突变。虽然目前尚未完全搞清楚引起这些变异的确切原因，但一般认为空间环境引起的遗传变异可能是多因素的综合诱变，其中的宇宙辐射和微重力为主要因素，二者间具协同作用，或至少是双重的作用。

宇宙辐射是引起植物诱变的重要因素。卫星和飞船飞行的空间存在着各种质子、电子、中子、α粒子、高空重离子等高能粒子以及 X射线、γ射线、紫外线和其他宇宙射线，它们作用于飞行器中的生物，是有效的变异源。如当植物种子被空间高能重粒子击中后，种子细胞中会发生多重染色体畸变，而且高能重粒子击中的部位不同，畸变发生程度亦不同。以根尖分生组织和胚性细胞被击中时畸变发生频率最高。也有研究表明生物膜尤其是核膜是射线作用的靶子。DNA被击中后的断裂或其他损伤能引起细胞的一系列修复活动，若损伤未被修复或修复错误，将最终引起植物自身染色体产生缺失、突变、重组及易位等，从而在植株水平上表现为生理性损伤和性

状的可遗传性变异。

在近地高空条件下，微重力对植物的向性、生理代谢、激素分布、Ca^{2+}分布和细胞结构等均有明显影响；同时微重力也是产生变异的重要原因之一，微重力能够使细胞分裂紊乱，染色体浓缩，核小体数目减少和染色体畸变等。也有人认为，微重力对空间植物材料引起的诱变作用是通过提高植物对诱变因素的敏感性实现的，微重力将阻碍或抑制 DNA的修复，加剧染色体 DNA 损伤和变异的发生。

随着基因组研究的深入和发展，最近中科院遗传所专家发现了新的诱变机制——转座子说。研究认为，太空环境使染色体上潜伏的转座子激活，活化的转座子通过移位、插入和丢失等，导致基因的变异和染色体畸变。基因组序列测定表明，在植物中存在大量转座子序列和逆转座子序列，太空环境激活了这些转座子，致使搭载植物发生变异。这一新的发现进一步丰富了航天诱变育种机制的研究内容。

进行航天育种时应考虑以适于搭载的植物干种子、无性繁殖植物的块茎、块根等为试验材料，目前一般选择那些正在推广利用的综合性状好，而仅有个别缺点的植物品种或自交系的种子作为搭载对象。当然，与其他育种途径相结合，航天育种更能发挥其优势，如与杂交育种相结合时可搭载优良杂交组合的早期世代的种子（F_0，F_1，F_2 等），将有利于增加优良性状基因重组的机会，提高多目标性状重组体选择的效率。

三、方法步骤

（一）航天育种程序观察

由任课教师或育种科研人员结合育种科研田试验材料，系统讲解航天育种各世代的种植、表现、工作内容、收获等工作环节。

1. SP_1 代

以飞船搭载植物纯系品种的干种子为例，按不同材料顺序点播或稀条播，同时播种未处理的原品种作对照。由于太空辐射等造成的生理性损伤，SP_1 代常表现出苗率低，生长势差，发育滞缓，植株变矮，畸形、不育甚至在生长发育期间夭亡等现象。由于搭载植物类型及处理条件（如气球低空搭载）的不同，也可能出现与以上相反的情况。这些性状变异不论优劣，多数并不遗传，其中的可遗传的突变又与生理损伤交织在一起，难以区分。因此，除对个别符合育种目标要求的显性突变进行选择外，一般不进行选择。SP_1 代的收获方式有单穗收获、单株收获和以处理为单位的混合收获等，其中单株收获方式较为常见。

2. SP_2 代

根据 SP_1 的收获方式相应种成 SP_2 世代，以单株收获方式收获的，SP_2 代分株种植成株系（株行），同时播种未经处理的原品种和当地推广品种作对照。为使植株个体性状充分表现，宜稀植点播，以利于调查计算性状突变频率，并有利于优良变异的选择。SP_2 代是突变显现最多的世代，也是选择的关键世代。对于发生性状分离的株系，则从中选出有经济价值的突变株留种。一些单（寡）基因隐性突变性状在 SP_2 世代即可显现，要仔细观察鉴定。

3. SP_3 及以后世代

SP_2 世代当选的单株在 SP_3 代仍种成株系，种植密度与生产大田相当，宜采用条播方式播种，每隔一定的行数种植当地推广品种为对照。在 SP_3 代要对各个株系进行评定，淘汰性状不良

的株系。对综合性状优良且表现稳定的株系，可混收其中性状表现相似的优良单株，升级为品系参加下年的品种比较试验；对性状分离的优良株系，仍需继续从中选择优良单株，待以后世代性状稳定后再升级参加产量比较试验。SP_4 及以后世代材料的处理与 SP_3 相似。航天育种性状变异稳定快，一般至 SP_4，SP_5 世代即可结束分离世代的选择。

（二）调查太空环境对 SP_1 代的生理影响和 SP_2 代恢复的情况

1. 常规种子发芽试验

分别随机数取经太空搭载的某水稻品种的稻粒 SP_1 代（即刚刚搭载过的稻粒）、SP_2 代（SP_1 代收获的稻粒）、CK（未进行航天处理的对照）各 100粒，重复 3次。30℃温水浸种 24 h后，均匀放置于发芽盒的砂床上。发芽盒需预先制备，将 0.6 mm粒径的细砂冲洗后放入瓷盘内，于 120～140℃烘箱内烘 3～4 h，取出冷凉后，加适量蒸馏水拌匀（以手压砂不出现水膜为度），然后将湿砂放入发芽盒，砂厚度 2～3 cm，摊平。种子放置于砂床后，其上再盖 1 cm左右的湿砂，以保持湿度。将发芽盒放置于 25℃发芽箱进行种子发芽，其间每天检查发芽箱温度并适量补充水分，3 d后统计发芽势，第七天调查发芽率。

2. 田间生长发育观察试验

同年分小区播种，种植同一水稻品种 SP_1 代、SP_2 代、CK（未进行航天处理的对照）的植株，每小区不少于 100株，重复 3次。以出苗率、成活率、株高、成熟期等反映植株生理损伤程度。

（三）调查 SP_2 代性状的变异

分组调查 SP_2 代主要育种目标性状变异的分离情况，并以未经搭载处理的原品种作对照。可选取调查的性状包括产量、抗倒性、抗病性、生育期等。

当 SP_2 代按株系种植时，某性状突变频率以该性状发生突变的株系数占 SP_2 种植总株系数的百分数表示；SP_2 代混合种植时，某性状突变频率则以该性状发生突变的株数占 SP_2 种植总株数的百分数表示。

四、作业思考题

1. 航天育种有何特点？较之其他育种途径，它有哪些方面的优势？

2. 航天育种如何与其他育种途径相结合，提高育种效率？

3. 将实验结果填入表 2－7和表 2－8。分析在水稻或其他植物育种中哪些育种目标性状较适宜采用航天育种方法进行改良。

表 2－7　太空搭载对种子发芽和植株生长发育性状的影响

材料名称	世代	发芽势 /%	发芽率 /%	出苗率 /%	成活率 /%	株高 /cm	成熟期 /d
	SP_1 SP_2 CK						
	SP_1 SP_2 CK						
	SP_1 SP_2 CK						

表 2－8　SP_2 代主要性状突变频率

材料名称	处理	单株穗数			主茎穗粒数			千粒重		
		表型值/个	变异系数/%	突变频率/%	表型值/粒	变异系数/%	突变频率/%	表型值/g	变异系数/%	突变频率/%
	SP_2									
	CK									
	SP_2									
	CK									
	SP_2									
	CK									
	SP_2									
	CK									

（李宪彬）

中篇　鉴定变异

第三章　植物经济性状鉴定技术

实验 15　植物杂种优势测定技术

杂种优势是生物界的一种普遍现象，是指两个遗传性状不同的亲本杂交所产生的杂种在某些性状或综合性状方面优于其亲本的现象。关于亲本经济性状在杂交一代（F_1）中的遗传表现，已有多年的研究历史，所采用的研究方法也很多。研究亲本经济性状在杂交一代（F_1）的遗传表现，对杂交玉米的亲本选配具有重要的作用。它不但可以有计划、准确地组配出强优势的杂交种，而且对丰富育种理论也有重要意义。

杂种优势的表现是多方面的，常表现在以下 4个方面。

⑴ 营养方面

苗势旺，植株生长势强，营养体增大，绿色光合期长等。

⑵ 生殖和生长方面

生殖器官增大，结实性增强，果实及子粒产量提高等。

⑶ 品质性状方面

有效成分含量高，产品外观品质好及整齐度高等。

⑷ 生理功能方面

适应性强，抗病虫性提高，对环境抵抗能力强，光合能力提高等。

本实验（以玉米为材料）使同学进一步理解和明确杂种优势的含义，掌握利用优势指数测定杂种优势的方法，初步了解杂种一代（F_1）与亲本间经济性状的遗传表现，以便在组配杂交种时有预见性地选择亲本。

一、试材及用具

1. 试材

玉米杂交种及其亲本自交系若干。

2. 用具

钢卷尺、米尺、天平、卡尺及铅笔等。

二、方法步骤

本实验以玉米为例进行。

（一）确定测定公式

在当前玉米育种中应用较多的是遗传力估算法和杂种优势指数测定法。优势指数测定法比较简便，是当前测定玉米杂种一代与亲本自交系间重要经济性状遗传表现常用的一种方法。

优势指数的计算公式如下：

$$\text{优势指数 (1)} = \frac{F_1 - \frac{1}{2}(P_1 + P_2)}{\frac{1}{2}(P_1 + P_2)} \times 100\%$$

$$\text{优势指数 (2)} = \frac{F_1 - P_{EX}}{P_{EX}} \times 100\%$$

式中：F_1——代表杂种一代某性状的平均值

P_1、P_2——分别代表两亲本某性状的平均值

P_{EX}——代表某性状数值最大的亲本的此性状平均值

（二）实验分组，确定材料

根据各实验班情况，划分实验小组，一般每组 3～5人。每个实验小组确定 1～2杂交组合：$P_1 \times P_2 \rightarrow F_1$。

（三）选株测定指标

对于每一个杂交组合，在各自的 P_1、P_2 和 F_1 中各选取有代表性的植株 5～10株，分别测定如下指标：株高，果位高，双穗率，果穗同位叶长，果穗同位叶宽，雄穗分枝数，茎粗，果穗长，穗行数，行粒数，穗粒重，出籽率，千粒重，轴粗等。

（四）计算杂种优势

根据杂种优势测定公式，计算各杂交组合的优势指数。

三、作业思考题

1. 将计算测定各项的优势指数填于表 3－1。

2. 根据你的计算分析结果，你认为选配杂交组合时，怎样搭配两个亲本的穗行数和行粒数，可使得杂种一代产量高？

表 3－1　玉米杂交种（F_1）经济性状优势指数测定

类型	株高	穗位高	叶长	叶宽	双穗率	雄穗分枝数	抽雄期	吐丝期	茎粗	叶数	全生育期	苞叶长度	穗粗	穗长	穗行数	行粒数	穗粒数	千粒数	轴粗	出籽率	穗型	秃顶率
P_1 F_1 P_2 优势指数																						
优势指数（X）																						

（李常保）

实验 16　植物杂种后代性状遗传分析

植物杂交育种，就是利用具有不同遗传特点的亲本相互杂交，通过基因重组，将不同亲本的优良基因，综合于杂种后代之中，并通过人工培育和定向选择，选育出新的优良品种。

杂种后代性状遗传变异特点不同，而且杂种后代各个性状的遗传表现也非常复杂。同一性状在不同年份、不同地点、不同杂交组合中表现不同；不同性状在同一组合、同一世代表现也不相同。因此，各个性状在不同世代选择的可靠性和有效性差别很大。育种工作者只有了解和掌握杂种后代的遗传动态及特点，才能善于利用各经济性状在不同世代的遗传变异规律，为亲本选配和杂种后代的有效选择提供科学依据。

实验目的是通过观察分析，了解植物杂种后代若干品质和数量性状的遗传趋势以及杂种不同世代遗传变异的特点，从而提高对杂种后代选择的预见性，克服盲目性，增强选择效果。

一、试材及用具

1. 试材

小麦（水稻、豇豆等）杂交育种田杂种后代（F_1～F_5）。

2. 用具

田间种植计划书、米尺、钢卷尺、小刀、铅笔、记录本、天平及数粒板等。

二、方法步骤

本实验以小麦为例，分田间与室内分别进行。每个实验小组进行以下观察分析：

1. 根据性状特点选择合适的父、母本，组配相应杂交组合。对不同杂交组合分别自交传代，田间种植父、母本以及不同世代材料（F_1～F_5）。

2. 按指定的一些杂交组合，观察 F_1 及亲本的性状表现，分析若干品质和数量性状的遗传规律。

3. 观察 F_1 代植株间同一性状遗传变异的一致性，区分正交与反交，单交与复交 F_1 间性状的变异有无差别。

4. 观察 F_2 代的性状分离现象，不同组合、不同性状分离的范围、类型和数目，F_2 代及以后不同世代分离程度及其稳定速度的差异，不同亲本、不同组合、不同杂交方式以及不同性状的稳定速度有无差异等。

5. 各实验小组可酌情确定一些性状进行观察分析。观察分析的有关品质和数量性状大体包括：株高，茎色，蜡粉有无，叶色，叶耳色，叶相，叶长，叶宽，穗型，穗色，茸毛有无，穗长，小穗数，小穗密度，穗粒数，单株有效穗数，芒有无，芒长，子粒质地，粒色，千粒重，腹沟深浅，早熟性，抗病性，落黄性等。

三、作业思考题

1. 根据同一组合 F_1，F_2 及相应亲本材料的田间调查和室内考种结果，计算几个主要数量性状的广义遗传力。

2. 小麦性状哪些是品质性状，哪些是数量性状，各性状在不同世代遗传变异特点是什么？

3. 根据小麦性状遗传和不同世代遗传变异特点的观测结果，你认为在杂种后代选择时应注意什么问题？

4. 对某一特定性状，请自己设计一个实验方案，分析该性状的遗传特点。

（李常保）

实验 17　植物配合力测定技术

1942年，Sprague和 Tatum在玉米杂交育种的研究中首次提出了配合力的概念。配合力指亲本（自交系或品种）某个数量性状对其杂种一代相应性状表现值影响能力的大小。配合力受多种基因效应支配，可以表示任何数量性状，但目前常指经济性状，一般主要指产量高低，通常用杂种一代所表现的产量水平来表示，表现高产的为高配合力自交系或品种，表现低产的为低配合力自交系或品种。配合力的本质是亲本所含有的对产量性状有利基因数目的多少和基因间互作能力大小的总和。

配合力是自交系的一种重要内在属性，只有配合力高的自交系间组配才能产生强优势的杂交种。因此，一个优良的自交系必须同时具备优良的农艺性状和较高的配合力。配合力不是由自交系本身的性状表现出来的，而是通过由自交系组配的杂交种的产量估算出来的。因此，配合力测定是自交系选育过程中一个独立而不可缺少的重要程序。

根据亲本评价的需要，可将配合力分为一般配合力（GCA）和特殊配合力（SCA）。一般配合力是指某个亲本品种与其他若干品种杂交后，杂种后代在某个性状上的平均表现。一般配合力是由基因的加性效应决定的，是可遗传的部分，其高低是由亲本所含有利基因位点的多少决定的。特殊配合力是指两个特定亲本所组配的杂交种的某个性状的表现。特殊配合力是由基因的非加性效应决定的，是不可遗传的部分。

由此可见，选育高配合力的自交系是组配强优势组合的基础。必须在一般配合力高的基础上再选择高的特殊配合力，才能获得最优良的杂交组合。

实验目的是通过本实验进一步加深对植物配合力概念的理解，认识植物配合力在植物杂交育种工作中的重要作用，掌握植物配合力测定的方法和技术。

一、试材及用具

1. 试材

若干玉米自交系，相应测交种。

2. 用具

钢卷尺、小型脱粒机、天平、计算器、铅笔及记录本等。

二、方法步骤

（一）测验种的选用

不同被测系与同一测验种杂交后，其测交种在产量上和其他数量性状上表现出的差异，即为这些被测系间配合力的差异。所以，测验种选用是否得当，直接关系到配合力测定的准确性。

常用的测验种一般为两种类型，一类是遗传基础复杂的群体，如品种、杂交种、综合群体等，与被测系杂交所形成的测交种相当于若干杂交种的混合物，因此测出的结果为一般配合力；另一类是基因型纯合的自交系，测交种即为单交种，测出的配合力为特殊配合力。

测验种本身的配合力高低以及测验种与被测系间的亲缘关系，也是影响测交结果准确性的重要因素。在测定一般配合力时，测验种的配合力应为中等水平，过高或太低都会掩盖被测系之间的差异；在测定特殊配合力时，测验种的配合力应为最高，以便选择出强优势的组合直接用于生产。不论测定哪种配合力，测验种都必须与被测系具有较远的亲缘关系，以防影响测定结果的可靠性。

利用多个自交系作测验种，分别与每个被测系测交，可同时测定自交系的一般配合力和特殊配合力。在育种实践中常采用该方式。

（二）测定配合力的时期

自交系配合力的测定可在表型选择的不同世代进行，一般分为早代测定（S_1～S_2），晚代测定（S_3～S_6）和中代测定（S_3～S_4）。中代测定配合力可与表型选择同步进行。目前，国内外多数育种单位都在中代测定自交系的配合力。

（三）配合力测定的方法

常用的配合力测定方法有：顶交法、骨干系法和双列杂交法。

1. 顶交法

选用一个遗传基础广泛的品种群体作测验种测定被测系的配合力。此法测定一般配合力。

具体做法：利用综合杂交种或普通品种作测验种，被测系作母本，采用多株混合花粉授粉，或设置隔离区采用“一父多母”方式配制测交种。根据测交种产量结果计算出各被测系的一般配合力。

顶交法较为简便，适合在早代测定大量穗行的一般配合力。在晚代被测系数目较多时也可采用。

2. 骨干系法

利用几个优良的自交系或骨干系作测验种与一系列被测系测交，以便同时测定被测系的一般配合力和特殊配合力。该法主要优点是可以测用结合，在测定配合力的同时，选择强优势组合直接用于生产，简化育种程序，促进新杂交组合的选育和利用。当前，国内外多数育种者经常采用该法。

具体做法：选用 4～6个优良自交系作为测验种。当被测系数目较少时，以测验种作为共同的母本或父本，进行人工套袋杂交；当被测系数目较多时，以被测系作母本，以测验种分别作父

本，在若干个隔离区内配制测交种。根据测交种产量比较结果，可计算出每个被测系的一般配合力和各组合的特殊配合力。

3. 双列杂交法

该法可同时测定一般配合力和特殊配合力。将被测系互为测验种，彼此间相互成对杂交，然后进行测交种比较试验，根据产量结果计算出每个被测系的一般配合力和各组合的特殊配合力。例如有 n个被测系，则可配成 n(n－1)个正反交组合。

该法手续较复杂，工作量较大，被测系数目较多时难以实施。

（四）配合力测定

本实验以玉米自交系为材料，采用骨干系法，在中代进行玉米自交系配合力的测定。具体步骤如下：

1. 测验种的选择

选用生产上常用的 4～6个优良自交系作测验种。

2. 待测系的确定

根据育种目的，确定所要测定配合力的自交系。

3. 测交种的获得

在隔离区间，进行测验种和待测系的测交，获得相应测交种。

4. 测交种的产量测定

田间种植各测交种，测定其产量。

5. 配合力的测定

根据测交种产量比较结果，计算出每个被测系的一般配合力和各组合的特殊配合力。

三、作业思考题

1. 根据测交种的产量结果，统计计算被测系的一般配合力和各组合的特殊配合力。
2. 在植物育种工作中，你认为配合力测定有什么价值？
3. 你认为配合力测定与植物杂种优势利用有什么关系？

（李常保）

实验 18　植物单株选择技术

通过各种途径进行植物育种和良种繁育，都要进行一系列的选择工作。选择包括组合选择，单株选择，品系选择等许多环节，而单株选择是基础。单株选择包括田间选择和室内考种选择两部分内容，本实验主要学习田间单株选择，室内考种选择部分请参考实验 22。

单株选择是植物育种和良种繁育的关键技术环节，熟练掌握单株选择的标准和方法是进行育种和良种繁育的一项基本功。选择单株的标准因育种目标、育种途径和选择世代的不同而有所差异。杂交育种中的单株选择，要根据育种目标、亲本材料特性和后代分离情况综合考虑，选择综合了双亲优良性状的单株。系统育种的单株选择，根据育种目标和选株的基本材料确定具体的选择标准。良种繁育时，单株选择要根据原品种的典型性、丰产性、优质性综合考虑，三性兼顾。

在杂交育种的不同分离世代，选择的性状和标准也应有所侧重。在早期分离世代，重点对质量性状、少数基因控制的遗传力高的性状进行选择，选择标准要严一些，如株型、叶形、抗虫性、抗病性及纤维强度等；对多基因控制的数量性状，如多数的产量性状，要求要适当放宽，到高世代再重点选择。

在杂交育种工作中，常采用系谱法对杂种后代进行单株选择。单株选择一般从杂种分离世代开始，一直延续到选出优良的品系。但早代的选择更为重要，选株的重点是在 F_2 和 F_3 代。在 F_2 代首先按照育种目标评选出优良的杂交组合，作为选择优良单株的重点；其他非重点组合，如有优良单株也应选出。在 F_3 代，应首先评选出优良的系统，然后再从中选择优良的单株；F_3 的其他系统如有优良单株，同样也应选出。

至 F_4 代及更高的世代，除对不稳定株系内的优良单株继续进行选择以外，选择的重点已转为优良品系的评定与选拔。如 F_3 的个别当选系统，性状优良而又整齐一致时，也可将整个系统内的植株混收成为一个品系。

本实验以小麦为材料，通过实际操作，学习和掌握植物杂种后代田间单株选择的标准和方法。

一、试材及用具

1. 试材

小麦育种试验田的杂种后代（F_2 ～F_7）材料。

2. 用具

田间种植计划书、纸牌、米尺、钢卷尺、计数器、铅笔及记录本等。

二、方法步骤

本实验以小麦为材料，对杂种后代进行田间单株选择。

对于杂种后代进行的单株选择可分为田间选择和室内考种两个过程，其中以田间选择为主，室内考种为辅。田间选择主要应在苗期、抽穗至成熟等几个阶段进行。

苗期主要针对幼苗生长健壮情况，分蘖力强弱、幼苗习性、越冬性等进行选择。所选单株可用红绳或挂牌标记。选择时间一般在 12月中、下旬至返青以前。

小麦抽穗以后，很多性状都表现出来，所以从抽穗至成熟是选择的关键时期。在此阶段，要根据育种目标，在苗期选择的基础上，对株高，穗子大小，穗部结构好坏，株型等性状进行全面评选，并对抗病性、抗逆性进行调查鉴定。

收获前，在前期评选的基础上，结合成熟早晚及熟相等进行田间最后一次决选。同时，也要注意选留一些综合性状并不太好，但具有某些独特优良性状的特殊材料，以用作今后育种的亲本。

选中的单株按组合分别收获，当选株系混收为品系，带回室内考种。最后根据田间表现优劣，结合室内考种结果，对当选单株进行综合评定，以决定其取舍。

表 3－2针对不同对象的评定和选择给出了供考虑的性状，是基于实践经验列出的，仅供参考。

表 3－2　冬小麦各世代选择对象及选择时可考虑的性状

世代 / 性状	F_1	F_2		F_3		F_4 及以后世代		
	评选组合	评选组合	选择单株	评选系统	系统内选单株	评选系统群	评选系统	系统内选单株
返青迟早	√	√	√	√	√	√	√	
抽穗期	√	√	√	√	√	√	√	
越冬性	√	√	√	√	√	√	√	
抗病性	√	√	√	√	√	√	√	√
株高	√	√	√	√	√	√	√	√
穗长			√	√	√	√	√	√
总小穗数			√	√	√	√	√	√
千粒重			√	√	√	√	√	√
单株穗数				√		√	√	√
穗粒数				√		√	√	√
单株粒重				√		√	√	√
品质（测定）				√		√	√	

注：1. “√”为评定和选择时，供考虑的性状。

2. “性状”栏中数量或质量，在早期世代可目测估计，不一定实际计量。

1. 本次实验安排在性状表现最为集中的乳熟期进行。

2. 在小麦育种试验田教师介绍实验设计和田间区划，讲解实验内容和要求。以实验小组为单位，划分试验地段分工进行。在 F_2 及其以后的分离世代，根据育种目标，选择特别优良的单株。要求首先依组合、株系群、株系的顺序进行群体评选，然后在优良的株系内选择优良的单株。行端或缺苗断垄处，应提高选株的标准。所选单株挂纸牌作为标记。

3. 在教师的指导下，以实验大组为单位，对上述初选的特别优良的单株进行复评排队，以确定入选单株的重要程度及名次。

4. 实验过程中注意以下事项：

⑴ 种植选种材料的地力应当均匀，管理一致。

⑵ 选株避免在边行、行头进行。

⑶ 选株时要紧扣育种目标，并参照对照进行。

⑷ 田间选择时，根据不同世代、不同性状，掌握选择的重点。

三、作业思考题

1. 以实验小组为单位，按表 3－3格式进行登记。

2. 对杂种低世代和高世代的单株选择，应如何掌握选择的标准？

3. 在高产育种评选单株时，你认为应怎样考虑综合性状的主次？

4. 不同的生育时期，评选的重点性状是什么？

表 3－3　小麦育种材料田间评定登记表

地点　　班级　　小组　　姓名

杂交组合	当选单株行号	选株数量	主要特点	备注

（李常保）

实验 19　植物丰产性测定技术

在植物育种过程中，为了选育高产品种（系），就需要比较测定植物单株或品（株）系的丰产性。通常情况是，所选育品（株）系相对稳定时，不同品（株）系种植成小区，进行产量比较鉴定试验，也就是进行丰产性比较。不同类型的植物其丰产性构成因素也各不相同。

禾谷类作物（如玉米、小麦）的丰产性构成因素为：

小区产量（kg/hm^2）＝单位面积株数 ×单株果穗数 ×每穗粒数 ×千粒重（kg）/1 000

经济农作物（如棉花）的丰产性构成因素为：

小区籽棉产量（kg/hm^2）＝单位面积株数 ×单株铃数 ×单铃重（g）/1 000

小区皮棉产量（kg/hm^2）＝单位面积株数 ×单株铃数 ×单铃重（g）×衣分 /1 000

蔬菜作物（如番茄、黄瓜及辣椒）的丰产性构成因素为：

小区产量（kg/hm^2）＝单位面积株数 ×单株果数 ×单果重（g）/1 000

进行植物丰产性比较测定，是为了将高产的品（株）系选育出来。本实验以玉米为材料，了解植物丰产性测定的原理，掌握植物田间调查和产量测定的原则、标准和方法，以有利于植物优良品种（系）的选育和推广。

一、试材及用具

1. 试材

小麦、玉米、棉花等农作物或番茄、辣椒、黄瓜等蔬菜作物的育种田。

2. 用具

钢卷尺、皮卷尺、卡尺、天平、计算器及记录本等。

二、方法步骤

本实验主要是以玉米为例，借以了解整个禾谷类作物品种（系）的丰产性测定技术。可在乳熟末期进行初测，在蜡熟末期进行实测。

（一）设点

根据植物品（株）系种植小区的大小和分布，采用合适的方法选点。选点的数目要酌情而定。不管点多点少，所取样本一定要有较大代表性，要求分布均匀。一般情况下选取 3～5个点。

（二）取样

每点选取 20～30株，调查空株率、折断株率、双穗株率和单株果穗等。

（三）丰产性指标的测定

根据行、株距，计算小区株数，根据所选取的单株，调查子粒行数及每行子粒数，计算单穗粒数，将果穗晒干、脱粒，称其果穗重、子粒重及千粒重，并求出果实产籽率等。

（四）根据以上调查结果，计算小区产量

$$\text{小区产量（kg/hm}^2\text{）}=\frac{\text{单位面积株数}\times\text{单株果穗数}\times\text{每穗粒数}\times\text{千粒重（kg）}}{1\ 000}$$

附：记载项目标准与方法

1. 双穗率（%）

单株双穗（指结实 10粒以上的果穗）植株占全样品植株的百分数。

2. 空株率（%）

不结实果穗或有穗但结实不足 10粒的植株占全样品植株的百分数。

3. 秃顶度（%）

秃顶长度占果穗长度的百分数。

4. 粒行数

果穗中部子粒的行数。

5. 穗粒数

单穗子粒的总数。

6. 果穗重（g）

风干果穗的重量。

7. 穗粒重（g）

果穗上全部子粒风干重。

8. 产籽率 $=\frac{\text{穗粒重（g）}}{\text{果穗重（g）}}\times 100\%$

9. 千粒重（g）

自脱粒风干的种子中随机取出 1 000粒称重，要精确到 0.1 g。重复两次，如两次相差超过允许的 3% ～5%就需再做一次，取两次相近重量的平均。

三、作业思考题

1. 植物丰产性测定在育种中有何作用和意义？
2. 针对不同植物类型，如何确定植物丰产性构成因素？
3. 在丰产性测定中，发生误差的主要原因是什么？应如何改进或避免？

（李常保）

实验 20　果树丰产性鉴定技术

果树的产量是主要的经济生物学性状，而这一重要性状的表现是基因型和环境因素相互作

用的结果。果树产量的鉴定，必须在环境因素一致的前提下，才能反映遗传型的差异。

果树产量鉴定通常需 4～5年连续测定单株的平均产量，再计算单位面积的产量。组成单株产量的因素对不同种类的果树来说，其侧重的性状是有一定差别的。

浆果类（葡萄）单株产量 =结果枝数 ×结果枝的平均果穗数 ×果穗的平均重量

仁果类（苹果、梨）单株产量 =结果枝数 ×结果枝的平均着果数 ×单果平均重量

柑橘类单株产量的鉴定又要区分种类。宽皮柑橘类是以正常果枝及退化果枝着果数统计，而橙、柚类的单株产量是以有叶顶果枝、无叶顶果枝、有叶花序果枝及无叶花序果枝分别统计着果率。

果树丰产性还可用结果系数来表示。结果系数是反映果树结果习性的综合指标，是构成产量最为重要的若干因素的乘积。以板栗为例：

板栗的结果系数 =（果枝数 /m^3）×（栗苞数 /果枝）×（栗数 /栗苞）×单果重

统计各类果树产量时还须注意采前有经济价值的落果数，要分别计算在单株产量中。了解果树产量构成因素，鉴定果树产量，对于果树有性杂交育种具有特殊的重要意义。

本实验旨在掌握果树产量组成的因素，比较分析品种、类型间产量组成因素的差异，并学习和掌握果树丰产性因素的鉴定方法。

一、试材及用具

1. 试材

葡萄、梨、桃、柑橘及苹果等代表品种的成年树。

2. 用具

钢卷尺、卡尺、天平、瓷盆、记载板、调查表及铅笔。

二、方法步骤

本次实验以葡萄为例，介绍单株产量鉴定的方法，仁果类、柑橘类及核果类等果树单株产量鉴定参照表 3－4，表 3－5，表 3－6。

表 3－4　仁果类（苹果、梨）品种单株产量因素调查表

品种	株号	总结果枝数	结果枝类型								各类果枝平均果数								总果数	单果平均重量 /g	单株平均产量 /kg
			长果枝		中果枝		短果枝		果台枝		长果枝		中果枝		短果枝		果台枝				
			数量	占总果枝 /%	数量	占总果枝 /%	数量	占总果枝 /%	数量	占总果枝 /%	总果数	平均每枝果数	总果数	平均每枝果数	总果数	平均每枝果数	总果数	平均每枝果数			

表 3－5　柑橘类品种单株产量因素调查表

品种	株号	总结果枝数	总果数	有叶顶果枝				有叶花序果枝				无叶花序果枝				无叶顶果枝				备注
				果枝数	占总果枝/%	着果数	占总果数/%	果枝数	占总果枝/%	着果数	占总果数/%	果枝数	占总果枝/%	着果数	占总果数/%	果枝数	占总果枝/%	着果数	占总果数/%	

表 3－6　核果类（桃、李、梅）品种单株产量因素调查表

品种	株号	总结果枝数	各类型结果枝数量					各类果枝平均果数					总果数	单果平均重量/g	单株平均产量/kg
			长果枝	中果枝	短果枝	花束状果枝	针刺状果枝	长果枝	中果枝	短果枝	花束状果枝	针刺状果枝			

（一）调查时间

当葡萄新梢长达 15 cm左右，已能辨别出结果枝与发育枝，并能数清结果枝上果穗数时进行。

（二）调查方法

自葡萄架上左边第一个一年生蔓开始，按次序向右推进，调查到最右边的一个一年生蔓为止（从多年生蔓上隐芽萌发出的蔓不计算在内）。每个一年生蔓均自其基部第一节（具有明显的节与芽）开始，按顺序向上调查，直到最顶端的节位。把每一节位的发枝情况，结果蔓上的果穗数，用一定符号记载在葡萄品种产量鉴定表内。每品种调查 5株，最后计算各品种产量因素的各个数值，并比较其丰产性，将调查数值填入表 3－7。

表 3－7　葡萄品种单株产量因素调查表

品种	株号	芽眼总数	发芽情况		结果枝数				结发果芽枝枝数数占/%	果穗总数	结果枝平均果穗数	平均果穗重量/g	单株产量/kg
			数量	占芽眼/%	一个果穗枝数	二个果穗枝数	三个果穗枝数	多个果穗枝数					

注：无效芽用符号 X，发育枝用符号 O 表示。

（三）结果计算

产量因素可用以下指标表示：

1. 发枝率 $=\frac{\text{发枝总数}}{\text{芽眼总数}}\times 100\%$

2. 结果枝率 $=\frac{\text{结果枝总数}}{\text{发枝总数}}\times 100\%$

3. 结果枝平均果穗数 $=\frac{\text{果穗总数}}{\text{结果枝总数}}$

4. 果穗平均重量 $=\frac{\text{果穗总重}}{\text{果穗总数}}$

5. 单株产量 =结果枝数 ×结果枝平均果穗数 ×果穗平均重量

三、作业思考题

1. 根据葡萄产量因素，调查统计品种的各项数值，比较不同品种的丰产性及其决定产量的重要因素。

2. 根据调查过的品种，试选配一个丰产性强的有性杂交亲本组合，并说明你想用的丰产因素是哪个？

（李常保）

实验 21　棉花纤维品质测定技术

棉花属于纤维类经济作物。棉花品质取决于棉花纤维的品质。棉花纤维品质的测定对于指导棉花育种工作具有重要意义。棉花纤维品质的指标主要有纤维长度、纤维强度、纤维细度和纤维成熟度等。棉花纤维品质测定的仪器种类较多而且更新换代较快，在此，每项品质指标的测定只选一种比较快速、准确、简便的仪器予以介绍。

实验目的是通过本实验的操作，了解并初步掌握当前测定棉花纤维主要品质指标（长度、强度、细度、成熟度）的基本方法，并根据测定结果评价棉属、种间及陆地棉品种间纤维品质的优劣。

一、试材及用具

1. 试材

中棉、非洲棉、海岛棉各 1个品种的棉样，陆地棉 3个有代表性品种的棉纤维。

2. 用具

Y146型光电长度仪、卜氏束纤维强力仪、纤维中段切断器、扭力天平、Y147型偏光成熟度仪、清花机、限制性绒板、1号夹子、镊子、梳子黑绒板、挑针及载玻片等。

二、方法步骤

在本实验中，根据所提供的棉花试样，各实验小组测定棉花的纤维长度、强度、细度与成

熟度。

（一）纤维长度的测定——光电长度仪法

1. 适用范围

光电长度仪法适用于从原棉中取出纤维的长度测定，也适用于从棉卷、棉条等半制品中取出纤维的长度测定。长度范围 25～31 mm。

2. 测试原理与仪器结构

⑴ 测试原理

实验试样经手扯稍加整理后，均匀地挂在特制的梳子上，通过两把梳子彼此反复梳理，使梳子上的纤维分布均匀，伸直平行。然后将梳子安置到仪器的试样架上，线光源垂直扫描棉束截面，光线透过纤维束，透射光束经导光板会聚到硒光电池上，转换为光电流。梳子连续向上移动，被光线扫描的纤维束截面积逐渐减小，透射光强度逐渐增大，光电流也随之增大，待梳子扫描到一定高度，光电流达到某一定值时，梳子上升的高度（y）与棉纤维手扯长度（L）呈极显著正相关（$y=0.7932L-0.4509$，$r=0.9721^{**}$），由此可以测得棉纤维的长度。这种光电法测得的相当于手扯长度的棉纤维的长度称为光电长度。

⑵ 仪器结构

Y146型棉纤维光电长度仪内部结构主要有光源、光路与电路、梳子升降架等 3部分，操作简便易行，测试速度快，10 min内可测 3个结果。

3. 实验步骤

⑴ 制样

从实验样品中取出约 350 mg的棉纤维，稍加整理后，将全部棉纤维均匀地挂在一把梳子上。以另一把梳子梳理前一把梳子上的纤维，从须丛的梢部到根部，逐渐深入，平行梳理，用力适当，避免拉断纤维。如此反复梳理，直到两把梳子上梳挂的纤维量大致相等，纤维平直、均匀。

⑵ 仪器准备

实验前仪器至少预热 20 min，使仪器达到稳定状态，并按说明书校验仪器。

⑶ 测试

① 翻上日光灯架，将两把梳取纤维的梳子按左右标志分别安放在梳子架上，用小毛刷自上而下分别将两把梳子上的试验须丛压平，刷直，并刷去纤维梢部明显游离的纤维。

② 翻下日光灯架，此时电表指针应指在表盘左边的红绿蓝“品”字形区域的某处，记住该处位置。如果指在该区域之外，即表明纤维数量过多或过少，则应取下梳子，去掉纤维，重新按上述方法梳取试样，以保证结果准确。

③ 逆时针转动手轮，实验试样逐渐上升，通过光路的试验须丛由厚逐渐变薄，电表指针随之向右偏移，当指针指在表盘右边的红绿蓝“品”字形区域的相应位置时，停止转动手轮。此时即可从长度刻度盘上直接读出该实验试样的光电长度，单位是 mm。

④ 翻上日光灯架，取下梳子，随即再翻下日光灯架（以保证光电池始终工作在稳定状态），然后顺时针转动手轮，降下梳架，使长度刻度盘上的起始红线与红色指针重合。

⑷ 实验次数

每份实验样品制备 3个实验试样，3次实验结果的算术平均值作为棉样的光电长度值。

（二）纤维断裂比强度的测定——卜氏束纤维强力仪法

束纤维断裂比强度的测定分零隔距和 3.2 mm隔距两种方式，前者用于贸易，后者用于纺织、科研部门。

1. 测定原理与仪器结构

⑴ 测试原理

卜氏束纤维强力仪是根据力矩平衡原理设计的，滑锤移动的距离与纤维束负荷成正比。在卜氏束纤维强力仪秤杆右方安装夹着一束纤维的卜氏试样夹持器，卜氏试样夹持器上下竖立，上半部与秤杆右臂连接。当右端闸刀抬起，秤杆左端下坠，滑锤即沿倾斜秤杆向左方移动，秤杆右端翘起，提拉卜氏试样夹持器上部。当滑锤移动加压到一定程度时，卜氏试样夹持器中的纤维束即被拉断。纤维束拉伸至断时所受的断裂负荷，可从卜氏束纤维强力仪上直接读出，而纤维束的长度已确定，所以只要再测出拉伸纤维束的质量，便可计算出纤维束的断裂比强度。

⑵ 仪器结构

卜氏束纤维强力仪比较简单，由卜氏试样夹持器、夹持器台钳及折断器 3部分组成。

2. 样品准备

从实验样品中随机取出棉样，例如 16小撮，通过不断地合并对分将它们混合，制成一份棉束。梳理棉束的一端，然后倒过来再梳理另一端。每份棉束至少要足够制备 6个实验试样。将每份棉束纵向分成 6个小束。每个小束在密梳上梳理 2～3次，以除去游离纤维、短纤维、棉结和杂质。对零隔距以及 3.2 mm隔距实验，应分别梳去 15 mm及以下和 20 mm及以下的纤维。试样的宽度要保持在 6 mm左右。

3. 卜氏束纤维强力仪的调整

将一块薄金属片放在卜氏试样夹持器中以防止移动和分离。把卜氏试样夹持器装入仪器的规定位置，调节卜氏束纤维强力仪底板上的调节螺丝，以校正滑锤轨道上的水平仪的水准，使卜氏束纤维强力仪达到规定的水平条件（轨道角度近似 1.5°）。校准后滑锤应能在一秒内从 25 N刻度滑行到 90 N刻度。

4. 测定

左手将折断器秤杆尾端稍稍抬起，右手将已夹有试样的夹持器放入前端的咬口内，然后左手轻轻放下秤杆。右手将秤杆右端的重锤闸刀轻轻抬起以释放滑锤，纤维断裂时滑锤即落下停止。从杆式刻度上读出读数，精确到 0.5 N。如果观察到的断裂负荷小于 45 N，则舍去该试样，重新实验。

打开夹头，用镊子取出断裂的纤维并测定它们的重量，精确到 0.01 mg。

5. 结果计算

零隔距实验时：　　$P_t = (F_r \times 1.18)/m$

3.2 mm隔距实验时：　　$P_t = (F_r \times 1.50)/m$

式中：$_t$——断裂比强度，cN/tex

F_r——断裂负荷，N

m——棉束重量，mg

计算结果精确到 1位小数。6次测定结果的平均值用修正系数校正后的结果代表该试样的

断裂比强度：$T=K\cdot P_t$

6. 注意事项

⑴ 本测定应在标准温度、湿度［(20±2)℃，65% ±3%］条件下进行，以防环境条件影响测试结果。

⑵ 每日测定前必须用校正棉样测试，求出修正系数 K。

修正系数 K＝校准棉样标准值/校准棉样观测值

(三) 棉纤维成熟度的测定——偏光仪法

目前生产的 Y147型偏光成熟度仪有两种，即普通型和电脑型。本实验仅介绍 Y147型棉纤维偏光成熟度电脑检测仪的使用方法，这也是目前正在推广使用的仪器。

1. 测试原理

从试验棉条中取出适量的纤维，经整理，梳去一定长度以下的短纤维，制成宽度为 25～32 mm的平行棉束，向着载玻片长边垂直方向将棉束放入载玻片与盖玻片之间。由于棉纤维具有双折射性质，平行光束经起偏振片，透过棉纤维和检偏振片后，射在硒光电池上，转换为电讯号。由于透过检偏振片的光强度与棉纤维的成熟度系数、成熟度比及成熟纤维百分率均呈正相关，因此通过一定的数学模型转换，可求棉纤维的成熟系数、成熟度比及成熟纤维百分率。

2. 制片 (直角拨取法)

⑴ 将试验棉条平放在工作台上，用一号夹子将棉条一端游离纤维拨去，使纤维基本平齐；夹出棉片 (纤维数量在 55～65根之间)用梳子梳去棉片中游离纤维，再用一号夹子夹住，离齐端 18 mm (长绒棉 20 mm)，梳去 18 mm或 20 mm以下短纤维，并使纤维平直均匀。

⑵ 将梳理棉片放在载玻片上，轻盖上另一载玻片，用小夹子夹紧，剪去露出载玻片两侧的纤维后待测。每试样做 3片。

3. 测试

开启电源开关，按复位键 (RESET)，显示 “Y－147”后显示 “Y”，表示主机已经进入监控状态。预热 1.5 h左右，待机内热平衡后即可测试棉样校正片。校正片测试值在允许误差范围内方可正常使用。其具体步骤如下：

⑴ 将夹有空白载玻片的试夹插入试样插口。

⑵ 将拨杆后移 (衰减片推入光路)，按满度键 (FR)，旋转电位器旋钮使显示器显示 “100”。

⑶ 拔出空白载玻片，将棉样试夹插入试样插口，按纤维数量键 (IA)，显示器显示纤维数量值。

⑷ 将拨杆前移，按偏光读数键 (IP)，显示器显示偏光读数值。

⑸ 按成熟系数键 (K_Z)，显示器显示成熟系数。如试样纤维数量超过规定，显示器显示 “EE”，需要重新制片。

⑹ 按成熟度比键 (M)、成熟纤维百分率键 (PM)，显示器即显示成熟度比、成熟纤维百分数值。

⑺ 同一棉样连续测 3次后，按成熟系数均值键 (K_Z)得成熟系数均值，按成熟度比均值键 (M)得成熟度比均值，按成熟纤维百分率均值键 (PM)得成熟纤维百分率均值。如测试不足 3次或超过 3次，按均值键均显示 “ERROR”，即操作有误。

⑻ 测试长绒棉时，应在按满度键（FR）前，按长绒棉成熟系数键（LK_Z），显示器显示“L”，即主机进入长绒棉测试状态。每试样测试 3次后，按长绒棉成熟系数均值键（LK_Z）得其成熟系数均值。

⑼ 操作顺序

细绒棉：RESET→ FR→ Ⅰ→ Ⅱ→ K_Z→ M→ PM　3次后 K_Z→ M→ PM

长绒棉：RESET→ LK_Z→ FR→ Ⅰ→ Ⅱ→ LK_Z　3次后 LK_Z

（四）棉纤维细度的测定——中段称重法

1. 测试原理

从试验棉条的纵向取出适量纤维，手扯整理成一端整齐的棉束，宽约 5～6 mm，用 10 mm纤维中段切断器将棉束切成 3段，称出中段重量，记数纤维根数，从而计算出纤维线密度的平均值。

2. 测试步骤

⑴ 整理棉束

实验样品先用手扯整理几遍，使纤维成为比较平直，一端整齐，宽约 5～6 mm的棉束。再根据棉花的种类，细绒棉梳去 16 mm及以下的短纤维，长绒棉梳去 20 mm及以下的短纤维。

⑵ 切断

将中段切断器夹板抬起，使上下夹分开，然后将梳理好的棉束平放在中段切断器上下夹板中间且与切刀垂直。细绒棉的棉束，整齐端露出夹板外 5 mm；长绒棉的棉束，露出夹板外 7 mm。棉束放于下夹板时，双手握持棉束两端，使纤维平行伸直，合上夹板，切断全部纤维。

⑶ 称重，记数根数

用扭力天平称取棉束中段的重量，精确到 0.02 mg。然后在显微镜下数其纤维根数。每试验棉条测定两次，取平均值。

⑷ 结果计算

$$T_t = [m_1 / (L \times n)] \times 10^6$$

式中：$_t$——线密度，mtex

m_1——棉束中段纤维重量，mg

L——切断纤维长度，L＝10 mm

N——纤维根数

三、作业思考题

1. 熟悉并掌握棉纤维主要品质指标的测试方法。

2. 将实验结果填入表 3－8，求出测试材料的平均纤维长度、强度、细度与成熟度。

3. 根据实验结果，简要评判一下材料间的纤维品质优劣与品质指标组合的合理性。

表 3－8　棉花纤维品质测定结果表

样品	纤维长度 /mm	纤维强度 /（cN• tex^{-1}）		纤维成熟度	纤维细度 /mtex	备注
		零隔距	3.2 mm隔距			

（李常保）

实验 22　作物室内考种

培育一个新品种，在用各种不同途径创造了许多材料后，必须通过田间和室内的鉴定和选择，才能评选出确实优良的材料。先根据丰产性、早熟性、抗病性和抗逆性对单株、株系、品系进行田间选择，再经室内考种鉴定相关经济性状，综合考虑，最后决选。

在田间选择的基础上，进行经济性状的鉴定，是对植物育种和良种繁育材料进行综合分析决定取舍的依据。本实验要求熟悉植物室内考种的基本项目和标准，掌握考种的一般技术方法，认识室内考种的重要性。

一、试材及用具

1. 试材

棉花、水稻、小麦及玉米等样品若干。

2. 用具

天平、小型轧花机、小钢尺、小梳子、大头针、黑绒板、考种表及铅笔等。

二、方法步骤

本实验以棉花为材料进行。

（一）单铃重

即每铃籽棉重量。单铃重受环境条件及结铃早晚影响很大，因此应以一定数量的棉铃作为一个样本来测定其平均数，如果进行单株选择，则以单株全部棉铃为样本；对于株行或品系，应以吐絮盛期中部果枝棉铃 30～50个为样本。

（二）衣分

衣分是指一定重量的籽棉轧花后，所得皮棉占籽棉重量的百分数。对于品种或高代品系，通常随机取 200～500 g籽棉轧花测小样衣分，最好将小区的全部籽棉轧花测大样衣分；对于早期品系，一般只测小样衣分；对于单株，以所收全部籽棉为样本。衣分 =皮棉重量 籽棉重量 × 100%

（三）纤维长度

纤维长度是棉花品质的一项重要指标，与纺纱工艺及成纱质量关系十分密切，也是棉花贸易中决定价格的重要因素。室内考种纤维长度的测定一般采用籽棉分梳法。具体操作如下：

1. 取有代表性的棉瓤 10～50个，每棉瓤取中部一粒籽棉。具体取样数因材料而异，单株材料取 10～20粒，株行材料取 20～30粒，品种、品系材料取 50粒。

2. 以棉籽脊为中线，用手或大头针将纤维向两边分开。随即用梳子从种脊开始慢慢向两边梳，把纤维完全梳直，至全部纤维平行为止，梳时尽量减少纤维断落。

3. 梳好后，用两手拉紧纤维，平直地放在黑绒板上（棉籽尖端向下），并把两端不整齐的游离纤维剔去，以同样方法将各粒籽棉梳好后贴好。

4. 然后用尺棱在纤维近梢刚好不露黑绒板处垂直纤维横截一个痕迹，用钢尺量两截痕间的距离，以毫米表示。将量得的数除以 2，即得每粒籽棉纤维的分梳长度，各样品测得数值的平均

数即为样品纤维分梳长度。

（四）长度整齐度

纺织工业不仅要求纤维长，而且要求长度整齐，以减少废花。品种不同纤维整齐度不同，品种纯度越高，纤维整齐度也越高。育种上表示纤维整齐度常用变异系数（CV）和纤维整齐度（%）来表示。

1. 变异系数

纤维长度标准差占平均长度的百分比。

变异系数（CV）＝S/$\bar{x}$×100%

式中：$\bar{x}$——各粒籽棉的平均纤维长度

S——各粒籽棉纤维长度的标准差

变异系数越大，表示纤维越不整齐，一般小于 5%为整齐，5% ～7%为中等，大于 7%为不整齐。

2. 纤维整齐度（%）

是指纤维平均长度加减 2 mm范围内的籽棉粒数占考察籽棉总粒数的百分数。

纤维整齐度（%）＝平均纤维长度 ±2 mm范围内的籽棉粒数/考察籽棉总粒数 ×100%

纤维整齐度一般以大于 90%为整齐，小于 80%为不整齐，80% ～90%为中等。

（五）籽指和衣指

从籽棉样品中取籽棉 100粒（每个棉瓤中部取一粒），轧出皮棉称重，重复 2～3次，取平均值以克表示，即得衣指；从轧花后的棉籽中随机取 100粒称重，重复 2～3次，取平均值以克表示，即得籽指。

陆地棉的籽指一般在 9～12 g左右，育种中一般选择籽指 10 g左右，籽指偏大，则种子饱满，生活力强，但往往衣分偏低；籽指偏小，则衣分较高，但种子小，饱满度差，顶土出苗力差。

（六）不孕籽率

随机取棉瓤，数 300～500 粒棉籽（含不孕籽），求不孕籽占总棉籽数的百分数，即为不孕籽率。

（七）种子考察

棉花种子的形态、短绒颜色和分布等均因种和品种而异，考察种子也可以了解品种（系）的纯度。每样品取 50粒棉籽，作为考察样本。以本材料大多数为准，根据鉴定结果计算出杂籽百分率。

1. 籽形

分卵圆形、短圆形、圆锥形等。

2. 短绒颜色

分灰籽、绿籽、褐籽、大白籽等。

3. 短绒分布

分光籽、端毛籽、毛籽 3种。

三、作业思考题

1. 将棉花室内考种结果填入表 3－9，对所鉴定材料作出简要评价。

表 3－9

材料	铃重 /g	衣分 /%	籽指 /g	衣指 /g	绒长 /mm	纤维整齐度 /%	不孕籽率 /%	杂籽率 /%	备注

2. 在植物育种工作中，室内考种鉴定的重要性和发展趋势如何？

（李常保）

第四章　植物品质性状鉴定技术

实验 23　植物种子物理性状测定

植物种子的物理性状是种子在成熟、加工或贮藏过程中，由于其内在或外表的变化所表现出来的多种物理性状，包括种子的千粒重、容重、密度、角质率、硬度、种子堆密度与孔隙度、种子的散落性等，它们或者与种子的营养品质、播种品质有关，或者与加工品质、贮藏特性有关。学习、掌握这些性状的测定方法并在选育品种及种子生产中及时、准确地进行所需项目的测定，有利于育种者对品种优良性状的把握及种子的安全贮藏。

Ⅰ　种子千粒重和容重的测定

种子千粒重与种子的饱满度、充实程度、颗粒大小、均匀度密切相关，是子粒产量构成的三大要素之一，是测产验收、质量评定的必测指标。容重主要与种子的形状、大小、化学成分、组织的致密度等密切相关，是粮食特别是禾谷类作物种子的重要品质指标。

一、试材及用具

1. 试材

中、小粒植物干种子。

2. 用具

小刮板、数种板或数粒仪、镊子、样品盘、天平（感量 0.1 g 0.01 g）、分样器及容重器等。

二、方法步骤

（一）千粒重测定

1. 样品处理

将待测种子除去杂质和其他植物种子，或采用净度测定（参见实验 65）后的净种子，混匀。

2. 数样

用电子数粒仪、真空数粒仪、数种板、小刮板或镊子等随机数粒。在应用小刮板或镊子人工数取种子时，每次数 5粒，100粒 1小堆，5或 10小堆再合并为 1大堆，以免发生错误。利用数种板可提高工作效率，但须注意数种板上的孔眼形状、大小是否合适，防止出现多取大粒或小粒的偏差。应用数粒仪数种速度快，节省时间，但要验证其性能和精确度后才能使用。中、小粒种子每份 1 000粒，大粒种子每份 500粒，特大粒每份 100粒，极小粒种子可称取每份 10 g进行计数再换算。每试样要求至少重复两次。

3. 称重

取数好的种子，大粒于感量 0.1 g的天平上称重，小粒于感量 0.01 g的天平上称重，计数，大粒种要换算成千粒重。

4. 结果计算

国家规定种子千粒重测定结果采用两份试样平均值表示，两份试样间允许差距为≤ 5%，超过时，应测第三份试样，取差距小而且在允许差距范围内的两份试样平均值作为测定结果。计算公式如下：

$$\text{差距} = \frac{\text{第一试样重量} - \text{第二试样重量}}{\text{试样平均重量}} \times 100\%$$

5. 国家标准水分种子千粒重的计算

通常测定的多为自然干燥的种子，不同来源尤其不同地区的种子水分不同，不便于千粒重水平上的比较。因此，必要时需将实测种子千粒重换算成规定水分下的千粒重。换算时可按国家颁发的种子分级标准所规定的水分来折算，折算公式如下：

$$\text{标准水分种子千粒重 (g)} = \text{实测千粒重} \times \frac{1 - \text{实测水分 (\%)}}{1 - \text{规定水分 (\%)}}$$

（二）种子容重测定

1. 将试样除去大型及细小杂质，并通过分样器 3次，使之充分混合。

2. 将容重器箱打开，熟悉其中的构件及摆放位置，包括容器筒、带开关的漏斗筒、空筒、粗秤杆、细秤杆、游砣、调节螺丝、容器座、排气砣、插片、平衡指板、支柱及天平支架等。

3. 安装校正天平，即将放有排气砣的容器筒挂于横梁吊环上，将大、小游砣移到“0”点处，调节平衡。

4. 将容器筒安在箱盖上的容器座上，插片插入插口内，排气砣置于插片上，然后将空筒套在容器筒上。

5. 将种子倒入漏斗筒内，再套在空筒上，打开开关，使种子流入空筒内。

6. 左手握住容器筒，右手迅速将插片抽出，这时排气砣落到容器筒底部，将里面空气排出，种子均匀落入容器筒内，然后将插片迅速而稳定地插入插口。

7. 取下漏斗筒，再将空筒连同容器筒从容器座上取下，用手指捺住插片，倒出多余种子，然后取下空筒，并倒出残留在插片上的少量种子，取出插片。

8. 将容器筒挂在天平上称重，精确度为 0.5 g 重复两次，重复间允许差距为 5 g 如果超出，测第三重复，选择符合允许差距的两个重复的平均值作为测定结果。

注意：

1. 试样除去大型杂质时可用直径 6 mm的圆孔筛筛理，除去其他杂质可按净度测定时规定的筛层筛理。

2. 种子倒入漏斗筒时，漏斗筒底部的开关必须关闭，种子漏毕应随手关闭开关。

3. 种子落入容器筒后，在插片未插入前，仪器不能有任何震动。

三、作业思考题

1. 写出实验报告，主要内容包括实验意义、测定程序、结果计算及换算公式。

2. 讨论种子千粒重的影响因素。

3. 分析种子容重差异的主要原因。

Ⅱ　种子的散落性、孔隙度和密度的测定

种子的散落性是判断种子贮藏安危，计算仓壁侧压力及清选分级的重要依据，用静止角和自流角作具体指标，一般种子圆形、光滑、含水量低、含杂少，其静止角和自流角小，表明种子散落性好。种子堆孔隙度的大小关系到贮藏的难易程度，与种子的形状、表面性状、含水量、含杂情况密切相关。种子的密度则反映种子的成分组成、组织的致密程度，与种子加工、处理密切相关。

一、试材及用具

1. 试材

小麦、玉米、大豆、水稻、油菜及蓖麻等植物种子。

2. 用具

玻璃缸、小漏斗、大漏斗、量筒（50 mL，100 mL）、量角器、特制量角器、长木板、玻璃板、比重瓶（25 mL，50 mL）及天平（感量 0.001 g）等。

3. 试剂

酒精或水、二甲苯。

二、方法步骤

（一）静止角的测定

1. 玻璃缸测量法

⑴ 将种子倒入正方形透明玻璃缸中，达容积的 1/3为宜，并摊平放在桌面上。

⑵ 慢慢将玻璃缸横倒，使缸内种子成一斜面，用量角器量其斜面与水平面所成夹角。

⑶ 重复 2～3次，求其平均值，此角即为该批种子的静止角。

2. 特制量角器测量法

⑴ 将大漏斗固定在 1 m高的试管架上，使种子通过漏斗自由地落于平面形成一个种子堆。

⑵ 将特制量角器的底边放于种堆斜面上，特制量角器垂线所指示的角度，即为该种子的静止角。

（二）自流角的测定

1. 取 10 g种子置于长方形木板（或玻璃板）一端摊平。

2. 将木板（或玻璃板）有种子的一端慢慢抬起，当种子沿木板（或玻璃板）开始滚动时，量木板（或玻璃板）和水平面所成的夹角∠1。

3. 将木板（或玻璃板）继续抬起，当绝大多数种子滚落完时，再量木板和水平面所成的夹角∠2。

4. 重复 2～3次，分别求其∠1，∠2的平均值，两角的幅度即∠1～∠2，为该种子在木板（或玻璃板）上的自流角。

（三）种子堆密度与孔隙度的测定

1. 将 50 g左右的小麦（或其他）种子，倒入有精细刻度的 100 mL量筒中，并使种面摊平。

认真观看种子在量筒内的体积（V_1）。

2. 取另一个有精细刻度的 50 mL量筒，倒入 40 mL酒精。

3. 将量筒内的酒精，慢慢地倒入盛种子的量筒，至液面与种面相平为止，并计算倒入酒精的体积（V_2）。则：

$$\text{孔隙度} = \frac{V_2}{V_1} \times 100\%$$

$$\text{密度} = 100\% - \text{孔隙度}$$

（四）密度的测定

1. 量筒测量法

⑴ 将酒精倒入有精细刻度的 100 mL量筒中达 50 mL左右（V_1）。

⑵ 准确称取 30 g左右的小麦（或其他）净种子（m），倒入有酒精的量筒内，并迅速观看酒精的体积（V_2）。则：

种子的绝对体积 $V = V_2 - V_1$

$$\text{种子的密度} = \frac{m}{V}$$

2. 比重瓶测量法

⑴ 准确称取小麦（或其他）净种子 3～5 g（m_1）。

⑵ 将二甲苯装入 50 mL的比重瓶中，盖上瓶塞，使二甲苯达到标线，并用吸水纸吸干溢在瓶外的二甲苯，并准确称重（m_2）。

⑶ 倒出少部分的二甲苯，将已称好的样品（m_1）放入比重瓶中，再加入二甲苯，盖好瓶塞，使二甲苯达到标准线，再用吸水纸吸干溢在瓶外的二甲苯，并准确称重（m_3）。则：

$$\text{种子的密度} = \frac{m_1}{m_2 + m_1 - m_3} \cdot G$$

式中：G——二甲苯的相对密度，在 15 ℃时为 0.863

三、作业思考题

1. 写出每一项测定的实验报告。
2. 分析影响种子散落性的因素。
3. 讨论种子堆孔隙度与密度的关系及在贮藏中的应用。
4. 讨论种子量筒法和比重瓶法两种测定法的优缺点及适宜范围。

Ⅲ　种子角质率和硬度测定

角质率和硬度是种子特别是禾谷类种子营养品质和加工品质的重要指标，是品质育种的目标项目，在品种选择和良种繁育中常进行此项目的测定。

一、试材及用具

1. 试材

小麦、大麦、燕麦、黑麦及水稻等禾谷类种子。

2. 用具

刀片或切断器、镊子、表面皿或培养皿、放大镜、子粒透视器 (图 4－1)、硬度计及种子盒等。

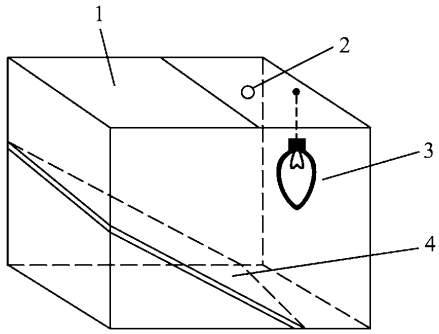


图 4－1　子粒透视器

1. 毛玻璃；2. 电源开关；3. 灯泡；4. 反射镜

二、方法步骤

(一) 角质率测定

1. 将待测样品去除不完整粒、不成熟粒，然后随机数取 100粒种子。

2. 将数好的子粒放在垫有白纸的玻璃板上，先进行外观鉴别，根据子粒角质 (蜡质、玻璃质) 胚乳和粉质胚乳所占比例分出角质粒、半角质粒和粉质粒。

3. 外观鉴别常不精确，要进一步用刀片或切断器于样品子粒最宽处横切，去掉一半，留下一半用感官或放大镜检视其断面，根据下列标准分成 3组：

(1) 角质粒

包括全角质和角质≥3/4者。

(2) 半角质粒

包括角质和粉质各占 1/2左右者。

(3) 粉质粒

包括全粉质粒和角质≤1/4者。

4. 鉴别还可用透视器法进行，其方法是：将样品置于透视器的毛玻璃上，接通电源，调节反射镜使光线反射到毛玻璃上的试样，亦按以上标准分出角质粒、半角质粒和粉质粒。

5. 结果计算，分别统计 3组粒数，按下式计算角质率：

$$\text{角质率} = \frac{\text{角质粒数} + \text{半角质粒数} \times 1/2}{\text{试样总粒数}} \times 100\%$$

每样品至少重复两次，求其平均数。

种子角质率测定亦可采用称量法，即称取一定量种子 (10～40 g)，将角质、半角质和粉质粒分别称重，以下式计算：

$$\text{种子角质率} = \frac{\text{角质粒重量} + \text{半角质粒重量} \times 1/2}{\text{供试种子重量}} \times 100\%$$

（二）种子硬度测定

1. 随机数取 10粒完整种子，两次重复。

2. 将单粒种子置于硬度计的样品台上。

3. 下压压柄，台面上升，使种粒与刀刃接触，继续下压，直至切断种面。

4. 记下测力计上的数值（kg）。

5. 按动复位按钮，使硬度计复位。

6. 连续测定 10粒种子作为 1个重复，求其平均数，再测第二个重复。最后以两次重复的平均数（kg/粒）作为该种子硬度。

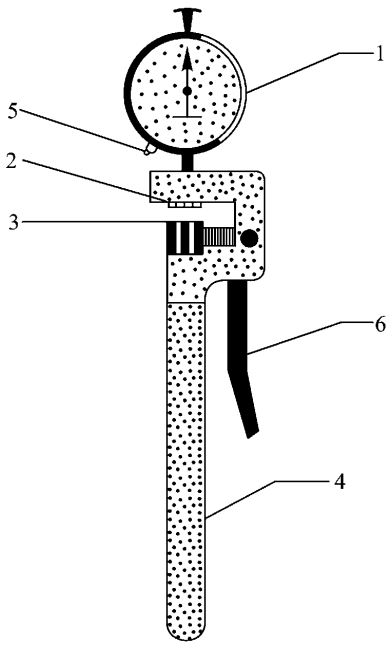


图 4－2　LYX携带式粮食硬度计

1. 测力计；2. 刀刃铡头；3. 样品台；4. 支架；5. 复位按钮；6. 压柄

种子硬度测定若要求高精度，可选用 SKCS4100型单粒谷物特性测定仪测定。

三、作业思考题

1. 测定几个小麦、水稻或玉米品种的角质率和硬度，并计算其结果。

2. 试述角质率、硬度与谷物种子品质的关系。

3. 影响种子角质率、硬度的因素有哪些？

（高荣岐）

实验 24　植物蛋白质含量的测定（半微量凯氏定氮法）

蛋白质广泛存在于动、植物体中。测定蛋白质的方法很多，一般是根据蛋白质的理化特性来

进行定量测定。在粮油食品品质分析中应用最普遍的是凯氏定氮法。近几年凯氏定氮法不断得到改进，微量法和半微量法代替了常量法，仪器分析代替了手工操作，并逐步向仪器自动化方向发展。常用的仪器有：瑞典 Tecator公司生产的 Kjeldhalsystem凯氏定氮仪，美国 Trebor公司生产的 Trebor 70和 80蛋白质分析仪器等。

本实验旨在使学生掌握植物蛋白质含量测定的原理，学会半微量凯氏定氮法测定植物粗蛋白的操作步骤和结果分析，为今后科学研究打下基础。

一、试材及用具

1. 试材

粮油种子和植物材料。

2. 用具

50 mL凯氏烧瓶、1 000 mL圆底烧瓶、100 mL锥形瓶、微量滴定管（5 mL，刻度 0.01 mL）、50 mL容量瓶、5 mL移液管及凯氏蒸馏装置等。

3. 试剂

⑴ 浓硫酸 +过氧化氢 +水混合液（2∶3∶1）

在 100 mL水中缓慢加入浓硫酸 200 mL，冷却后加入 30%过氧化氢 300 mL，混匀备用。此液于阴凉处可保存一个月。

⑵ 混合催化剂

10 g硫酸铜（$CuSO_4 \cdot 5H_2O$），100 g硫酸钾，0.2 g硒粉，在研钵中研细，通过孔径 0.45 mm筛。混匀后备用。

⑶ 40 g/100 mL氢氧化钠溶液。

⑷ 2%硼酸溶液。

⑸ 0.01 mol/mL HCl溶液。

⑹ 甲基红乙醇溶液

称取 0.1 g甲基红置于研钵中，加入少许 95%乙醇，研磨溶解后加入 75 mL 95%乙醇。

⑺ 次甲基蓝乙醇溶液

0.1 g次甲基蓝溶于 80 mL 95%乙醇中。

临用时将 ⑹和 ⑺两液按 2∶1比例混合即成。在酸域呈紫红色，pH5.5时无色，在碱域呈绿色。

二、原理

生物材料与浓硫酸共热时，硫酸分解为 SO_2，H_2O和 [O]，有机物氧化为 CO_2 和 H_2O，而有机物中氮转化为 NH_3，并进一步生成 $(NH_4)_2SO_4$。为加快有机物的分解，在消化时通常加入多种催化剂，如硫酸铜、硫酸钾和硒粉等。消化完成后，加入过量的浓 NaOH，将 NH_4^+ 转变成 NH_3，通过蒸馏把 NH_3 导入过量的硼酸溶液中，再用标准盐酸滴定，直到硼酸溶液恢复原来的氢离子浓度。根据滴定消耗的标准盐酸的量，计算总氮量。凯氏定氮法测定的含氮量乘以蛋白质系数，即为蛋白质含量。因不同来源的蛋白质含氮量不同，蛋白质系数也有差异。如麦类、豆类蛋白质系数为

5.70,水稻为 5.95,高粱为 5.83,其他谷物为 6.25,乳制品为 6.38,花生为 5.46,肉与肉制品为 6.25,芝麻、向日葵为 5.30。

三、方法步骤

（一）消化

用长条光滑硫酸纸称取试样 0.2～0.3 g,精确到 0.000 1 g(约含粗蛋白质 10～30 mg),直接送入凯氏烧瓶底部,加混合催化剂 1 g,同时加入浓硫酸混合液 3～5 mL,稍加振摇 (最好过夜)。消化时,将凯氏烧瓶斜置于电炉上。开始时用低温加热,切勿使瓶中泡沫超过瓶肚的 2/3,待泡沫减少和烟雾变白后再提高温度保持微沸,在此过程中可加入少量过氧化氢溶液,以促进消化过程。直至消化液呈浅蓝绿色的透明状时,再继续加热沸腾 10 min,取出消化液冷却至室温后,将消化液移入 50 mL容量瓶中,并用少量蒸馏水将凯氏烧瓶冲洗 3～4次,洗涤液一并移入容量瓶中,加水稀释至刻度,混匀备用。

（二）蒸馏

凯氏蒸馏装置如下图 4－3所示。它是由蒸气发生器、反应瓶及冷凝管等组成。按照图进行安装和蒸馏、吸收。在蒸气发生器大烧瓶 8(容量 1 000 mL)内加入蒸馏水 400 mL和少量碎玻璃片,加 5滴混合指示剂,加几滴酸液,使溶液呈紫红色,盖紧瓶盖,连接回流管 4、蒸馏瓶 1、冷凝器 2并检查有无漏气。量取 30 mL 2%硼酸溶液,注入三角瓶 (100 mL)中,作为承接器,加混合指示剂 1～2滴 (溶液呈灰紫色),置于冷凝器 2下面,使管尖端插入硼酸溶液 1 cm深处,用 5 mL移液管吸取 5 mL (V)稀释的消化液,由漏斗 5注入蒸馏瓶 1内,再倒入蒸馏水 10 mL冲洗漏斗 5。接着量取 40 g/100 mL NaOH溶液 2 mL,由漏斗 5注入蒸馏瓶 1内,再用 2～5 mL水冲洗漏斗 5,旋紧活塞,此时蒸馏瓶 1内溶液总体积应不超过容积的一半。

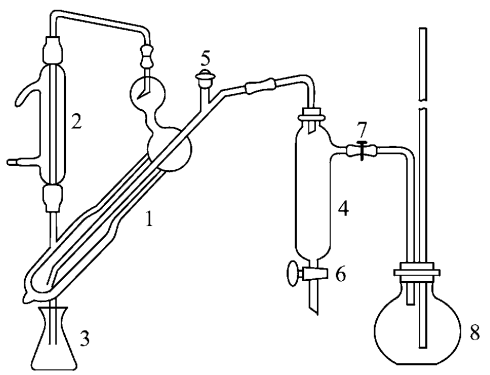


图 4－3　凯氏蒸馏装置

1. 蒸馏瓶；2 冷凝器；3. 承接器 (三角瓶)；4 回流管；5. 加液漏斗；6. 回流管端簧夹；7. 烧瓶处簧夹；8 蒸气发生器 (大烧瓶)

打开电炉加热烧瓶 8,打开烧瓶处簧夹 7,关闭回流管下端活塞 6,使沸腾蒸气通过回流管 4进入蒸馏瓶 1,再由蒸馏瓶 1经冷凝器 2流入三角瓶 3,待三角瓶 3内的溶液呈绿色时,开始记录时间,经 2～3 min后,将三角瓶 3放低,使冷凝器管 2下端离开液面,继续蒸馏 1 min,然后用少量蒸馏水冲洗冷凝器管 2下端,蒸馏即告结束。

蒸馏结束后，旋紧烧瓶处簧夹 7，断绝蒸气，这时由于回流管 4内蒸气气压立即降低，所以蒸馏瓶 1内的液体全部吸入回流管 4内，然后打开漏斗 5下簧夹，注入蒸馏水 40～50 mL于蒸馏瓶 1内，关闭漏斗 5下簧夹，打开烧瓶处簧夹 7，通入蒸气加热洗涤蒸馏瓶 1，再断绝蒸气，使洗涤回流至回流管 4中，打开回流管端簧夹 6，将回流管 4中废液弃去，再关闭此簧夹 4，为下次蒸馏做好准备。

（三）滴定

用 0.01 mol/L HCl标准溶液滴定三角瓶 3中的吸收液至出现淡紫红色时为止。记录所耗标准盐酸的体积。

空白实验除不加试样外，消化、蒸馏、滴定操作与样品相同。

（四）结果计算

粗蛋白质的干基质量分数按下面公式计算：

$$W=(V_1-V_0)\,c\times 14\times P\times(50/V)\times\frac{1}{m\times(1-M)}\times 100\%$$

式中：W ——粗蛋白质干基质量分数，%

V ——蒸馏时所用消化液体积，mL

V_1 ——实验消耗标准盐酸溶液的体积，mL

V_0 ——空白实验消耗标准盐酸溶液的体积，mL

c ——HCl标准溶液的浓度，mol/L

m ——试样重量，mg

14——氮的相对原子质量

P ——蛋白质系数

M ——试样水分含量，%

双试验结果允许差：粗蛋白质质量分数在 15%以下时，不超过 0.2%；粗蛋白质质量分数在 15.1%以上时，不超过 0.4%。求其平均数，即为测定结果，测定结果取小数点后 1位。

四、作业思考题

1. 什么是蛋白质系数？为什么不同来源的蛋白质系数有差异？
2. 简述半微量凯氏定氮法测定粗蛋白质含量的原理和方法步骤。

（田纪春）

实验 25　植物氨基酸总量的测定（茚三酮显色法）

氨基酸是一类含有氨基和羧基的有机化合物，是蛋白质的基本构成单位，也是蛋白质水解的最终产物。氨基酸的测定方法很多，根据测定的目的（定性或定量）、对象（氨基酸总量、游离氨基酸总量、个别氨基酸含量）和取材（谷物种子或植物茎、叶）的不同，可采用不同的测定方法。近几年，随着分析仪器的发展，一些重点实验室已采用了一系列微量、高效的分离方法，如液相色谱和氨基酸自动分析仪等方法，这些方法可快速、准确地分析氨基酸总量和 20种氨基酸的各自

含量。

本实验目的旨在使学生了解植物材料中氨基酸含量的各种测定方法，熟悉测试原理，掌握茚三酮显色法测定植物材料中游离氨基酸的测定步骤和结果分析。

一、试材及用具

1. 试材

植物新鲜组织或谷物粉样。

2. 用具

722型分光光度计、0.001 g感量天平、水浴锅、三角瓶、漏斗若干、研钵、容量瓶、试管及移液管等。

3. 试剂

⑴ 水合茚三酮试剂

称取 0.6 g再结晶的茚三酮置于烧杯中，加入 15 mL正丙醇，搅拌使其溶解。再加入 30 mL正丁醇及 60 mL乙二醇，最后加入 9 mL pH5.4的乙酸 —乙酸钠缓冲液，混匀，贮于棕色瓶中，置 4 ℃下保存备用，10 d内有效。

⑵ 乙酸 —乙酸钠缓冲液（pH5.4）

称取乙酸钠 54.4 g加入 100 mL无氨蒸馏水，在电炉上加热至沸，使体积蒸发至 60 mL左右。冷却后转入 100 mL容量瓶中，加 30 mL冰醋酸，再用无氨蒸馏水稀释至 100 mL。

⑶ 标准氨基酸

称取 80 ℃下烘干的亮氨酸 46.8 mg溶于少量 10%异丙醇中，用 10%异丙醇定容至100 mL。取此液 5 mL，用蒸馏水稀释至 50 mL，即为 5μg/mL的氨基酸标准液。

⑷ 0.1%抗坏血酸

称取 50 mg抗坏血酸，溶于 50 mL无氨蒸馏水中，随配随用。

⑸ 10%乙酸。

⑹ 60%乙醇。

二、原理

植物材料和谷物粉样的游离氨基酸含量是一个重要的代谢指标，一般实验中常用茚三酮显色法进行测定，其原理是在供热条件下，氨基酸与茚三酮的反应分两步进行，第一步：氨基酸被氧化形成 CO_2、NH_3 和醛，茚三酮被还原成还原型茚三酮；第二步：所形成的还原型茚三酮与另一个茚三酮分子和氨缩合生成茚二酮炔 —茚二酮胺（DYDA）。该产物显示蓝紫色，称为 Ruhemans紫。其吸收峰在 570 nm，而且在一定范围内吸光度与氨基酸浓度成正比。

三、方法步骤

（一）制作标准曲线

取 6支 20 mL刻度试管，按表 4－1操作。

表 4－1　制作游离氨基酸标准曲线各试剂量及操作程序

试剂	管　号					
	1	2	3	4	5	6
标准氨基酸体积 /mL	0	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0
无氨蒸馏水体积 /mL	2.0	1.8	1.6	1.4	1.2	1.0
水合茚三酮体积 /mL	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0
抗坏血酸体积 /mL	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
每管含氮量 /μg	0	1	2	3	4	5

加完试剂后混匀，盖上大小合适的玻璃球，置 80 ℃水中加热 15 min，取出后用冷水迅速冷却并不时摇动，使加热时形成的红色被空气逐渐氧化而褪去，进而呈现蓝紫色时，用 60% 乙醇定容至 20 mL。混匀后用内径 1 cm 比色杯中在 570 nm 波长下测定吸光度，绘制标准曲线。

（二）样品制备

取新鲜植物样品，洗净，擦干并剪碎，混匀后，迅速称取 0.5～1.0 g，于研钵中加入 5 mL 10% 乙酸，研磨均匀后，先用 50 mL 蒸馏水稀释混匀，再用干滤纸过滤到 100 mL 容量瓶中，反复冲洗残渣，最后定容至 100 mL 备用。若用谷物粉样，则称取 5.0～50.0 g（按样品含游离氨基酸不同而确定），加入 10 mL 乙酸，太稠时可适当加蒸馏水，其步骤同新鲜植物样品。

（三）样品测定

吸取样品滤液 1.0 mL，放入 20 mL 干燥试管中，加无氨蒸馏水 1.0 mL，其他步骤与制作标准曲线相同。根据样品吸光度在标准曲线上查得含氮量。

（四）计算结果

按下式计算样品中氨基态氮的含量：

$$100\ \text{g样品中氨基态氮含量}\ (\mu g) = \frac{C \times V_T}{V_S \times m} \times 100$$

式中：　——从标准曲线上查得的氨基态氮含量，μg

V_T——样品稀释总体积，mL

V_S——测定时样品体积，mL

m ——样品重，g

四、作业思考题

1. 本实验中为什么要使用抗坏血酸，其作用是什么？
2. 若测定植物材料中组成蛋白质的氨基酸，需要增加哪些步骤？
3. 茚三酮显色法可以测定的是哪种类型的氨基酸？该方法的优、缺点是什么？

（田纪春）

实验 26　植物淀粉含量及组分测定

淀粉是植物的主要贮藏物质，主要存在于植物的种子、块根、块茎及球茎等组织中。淀粉是由葡萄糖构成的多糖聚合体，其葡萄糖残基以 α－1，4 糖苷键构成直链状的直链淀粉，或以 α－1，4 糖苷键构成直链主干，由 α－1，6 糖苷键构成分支的支链淀粉。不同植物类型或品种所含的淀粉，因其直链和支链淀粉的构成比例不同，而具有不同的性质、用途。植物组织中，一般直链淀粉占 10% ～25%，支链淀粉占 75% ～90%。

淀粉不仅是人类主要的营养来源，而且是重要的工业原料。测定植物中淀粉的含量和组分，对于鉴定农产品的品质和加快农业产业化进程具有重要意义。

本实验的目的在于使学生掌握植物组织淀粉含量和组分测定的原理和技术。

Ⅰ　旋光法测定淀粉含量

一、试材及用具

1. 试材

各种植物种子、果实或块根、块茎等。

2. 用具

粉碎机、离心机、电子天平、旋光仪、三角瓶、分样筛（100 目）、布氏漏斗、抽滤瓶及真空泵、离心管及小电炉等。

3. 试剂

⑴ 氯化汞乙醇溶液

将 1 g $HgCl_2$ 溶解于 100 mL 水和 900 mL95% 乙醇中。

⑵ 80% 乙醇。

⑶ 95% 乙醇。

⑷ 醋酸氯化钙溶液

溶 $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 550 g于 760 mL蒸馏水中，溶解后，调节成在 20 ℃时的相对密度为 1.30，用冰醋酸调节 pH 为 2.30，再调相对密度至 1.30，必要时，可用布氏漏斗或玻璃滤器抽滤，以使溶液清澈透明。

⑸ 30% 硫酸锌溶液

称取 $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 30 g溶于蒸馏水中，稀释到 100 mL，混匀。

⑹ 15% 亚铁氰化钾溶液

称取 $K_4Fe(CN)_6 \cdot 3H_2O$ 15 g溶于蒸馏水中，稀释到 100 mL，混匀。

二、原理

酸性氯化钙溶液与磨细的含淀粉样品共煮，可使淀粉轻度水解，同时钙离子与淀粉分子上的羟基络合，这就使得淀粉分子充分地分散到溶液中，成为淀粉溶液。

淀粉分子具有不对称碳原子，因而具有旋光性，可以利用旋光仪测定淀粉溶胶的旋光度

(α),旋光度的大小与淀粉的浓度成正比,据此可以求出淀粉含量。

溶提淀粉溶胶所用的酸性氯化钙溶液的 pH 必须保持 2.30,相对密度须为 1.30,加热时间的长短也要控制在一定范围。因为只有在这些条件下,各种不同来源的淀粉溶液的比旋度 (α)才都是 203°,恒定不变。

样品中其他旋光性物质 (如糖分)须预先除去。

三、方法步骤

(一)样品准备

1. 称取样品

将样品风干,研磨,通过 100 目筛,精确称取约 2.5 g样品细粉 (要求含淀粉约 2 g 请参考表 4-2),置于离心管内。

表 4-2　主要粮蔬作物食用部分淀粉质量分数

作物名称	淀粉质量分数 (干重)/%	作物名称	淀粉质量分数 (干重)/%
稻谷	75～80	豌豆	20～48
小麦	49～70	大豆	2～9
玉米	58～83	马铃薯	10～23 (鲜重)
大麦	44～68	甘薯	29 鲜重)

2. 脱脂

加乙醚数毫升到离心管内,用细玻棒充分搅拌,然后离心。倾出上清液并收集以备回收乙醚。重复脱脂数次,以去除大部分油脂、色素等 (因油脂的存在会使以后淀粉溶液过滤困难)。

大多数谷物样品含脂肪较少,可免去这个脱脂手段。

3. 抑制酶活性

加含有氯化汞的乙醇溶液 10 mL到离心管内,充分搅拌,然后离心,倾去上清液,得到残余物。

4. 脱糖

加 80%乙醇 10 mL到离心管中,充分搅拌以洗涤残余物 (每次都用同一玻棒),离心,倾去上清液。重复洗涤数次以去除可溶性糖分。

(二)溶提淀粉

1. 加醋酸氯化钙溶液

先用醋酸氯化钙溶液约 10 mL加到离心管中,搅拌后全部倾入 250 mL三角瓶内,再用醋酸氯化钙溶液 50 mL分数次洗涤离心管,洗涤液并入三角瓶内,搅拌玻棒也转移到三角瓶内。

2. 煮沸溶解

先用蜡笔标记液面高度,再直接置于加有石棉网的小电炉上,在 4～5 min内迅速煮沸,保持沸腾 15～17 min,立即将三角瓶取下,置流水中冷却。

注意:

(1) 煮沸过程中要不时搅拌,勿令其烧焦。

⑵ 要调节温度，勿使泡沫涌出瓶外。

⑶ 常用玻棒将瓶侧的细粒擦下，并加水保持液面高度。

（三）沉淀杂质和定容

1. 加沉淀剂

将三角瓶内的水解液转入 100 mL容量瓶中，用醋酸氯化钙溶液充分洗涤三角瓶，并入容量瓶内，加 30% $ZnSO_4$ 1 mL混合后，再加 15% $K_4Fe(CN)_6$ 1 mL，用水稀释至接近刻度时，加 95%乙醇 1滴以破坏泡沫，然后稀释到刻度，充分混合，静置，以使蛋白质充分沉淀。

2. 滤清

用布氏漏斗（加一层滤纸）吸气过滤。先倾溶液约 10 mL于此滤纸上，使其完全湿润，让溶液流干，弃去滤液，再倾溶液进行过滤，用干燥的容器接收此滤液，收集约 50 mL，即可供测定之用。

（四）测定旋光度

用旋光测定管装满滤液，小心地按照旋光仪使用说明，进行旋光度的测定。

（五）结果计算

$$\text{淀粉质量分数} = \frac{\alpha \times N}{[\alpha]_D^{20} \times L \times m\,(1-K)} \times 100\%$$

式中：α——用钠光观测到的旋光度

$[\alpha]_D^{20}$——淀粉的比旋度，在这种方法条件下为 203°

L ——旋光管长度，dm

m——样品重量，g

K——样品水分含量，%

N——稀释倍数

也可以不用上列公式计算，改用工作曲线来求淀粉含量，这样准确度高些。

Ⅱ　碘比色法测定直链淀粉和支链淀粉含量

一、试材及用具

1. 试材

各种植物种子、果实，干燥、粉碎，过 40目筛。

2. 用具

离心机、冰箱、分光光度计、水浴锅、三角瓶（100 mL）、容量瓶（100 mL）、分液漏斗及移液管（1 mL、2 mL、10 mL）等。

3. 试剂

⑴ 6mol/L盐酸。

⑵ 质量浓度为 2%、10%氢氧化钠。

⑶ 碘试剂

称取 0.2 g碘和 2 g碘化钾于研钵中干研，然后用蒸馏水溶解并稀释至 100 mL。

⑷ 无水乙醇。

⑸ 丁醇。

⑹ 异戊醇。

二、原理

样品中的直链淀粉与碘作用生成纯蓝色络合物，而支链淀粉与碘作用则生成紫红色物质，二者皆具有特定的吸收峰。不同比例的直链和支链淀粉与碘作用，可生成由纯蓝到紫红的一系列颜色。若使两种淀粉含量之和保持不变，配制成不同比例的混合液，则此液中直链淀粉和支链淀粉的质量与消光度成比例。以此液质量分数为横坐标，消光度为纵坐标绘制标准曲线，再将试样测得的消光度对照此标准曲线，即可计算出试样中直链淀粉和支链淀粉的质量分数。

三、方法步骤

（一）直链淀粉与支链淀粉的提取与分离

1. 称取粉碎试样 10 g 加 5 mL无水乙醇和少量蒸馏水，先使试样湿润，然后加入 400 mL 2%氢氧化钠溶液，置 85 ℃水浴中分散 30 min（用玻棒不断搅拌），趁热放入离心管中，以 4 000 r/min离心 15 min。去掉未分散物，再以 6 mol/L盐酸中和，加入 50 mL丁醇和 50 mL异戊醇，继续在 85 ℃水浴中加热 30 min。

2. 待试样冷至室温，放入 0～5 ℃冰箱中冷却 24 h，然后离心 20 min。收集上层液于分液漏斗中，即为提取的支链淀粉。

3. 将离心沉淀物用蒸馏水洗两次，每次以与上同一速度离心 20 min。然后将沉淀溶于 200 mL被丁醇饱和的热蒸馏水溶液中，冷至室温，放入 0～5 ℃冰箱中冷却 24 h，再离心 20 min。沉淀物先用蒸馏水洗涤两次，再用乙醇洗两次，每次都以相同速度离心 20 min。将沉淀物放入真空干燥器中干燥，称重，即得直链淀粉。

4. 收集在分液漏斗中的溶液，静置后形成 3层，上层为醇层，中层为泡沫层，下层为乳胶层。取下层乳胶液，按体积加入 5倍量的无水乙醇，支链淀粉立即从液中析出。用无水乙醇洗涤两次，放入真空干燥器中干燥，称重，得到支链淀粉。

（二）标准曲线的绘制

1. 精确称取直链淀粉和支链淀粉各 0.100 0 g分别置于 100 mL容量瓶中，各加入 1 mL无水乙醇、10 mL蒸馏水，待样品湿润后，再加入 2 mL 10%氢氧化钠溶液，在 85 ℃水浴中分散至溶液清亮为止。取出容量瓶，用蒸馏水定容至刻度。

2. 按表 4－3所示比例，精确吸取直链淀粉（甲）和支链淀粉（乙）于 100 mL容量瓶中，分别加入 40 mL蒸馏水，用 6 mol/L盐酸调节 pH至 3左右，再加入 2 mL碘试剂，用蒸馏水定容至 100 mL。

表 4－3　标准曲线的绘制

混合液编号	1	2	3	4	5	6
甲液/mL	1.00	0.80	0.60	0.40	0.20	0
乙液/mL	0	0.20	0.40	0.60	0.80	1.00

3. 在波长 610 nm处，用 1 cm比色皿测定各混合液消光度，绘制标准曲线。

（三）试样的制备与测定

1. 先取 1份粉碎试样，用旋光法（或其他方法）测定淀粉含量。然后称取同一试样 m mg（使其中含干态淀粉 100 mg）于 100 mL容量瓶中，加入 1 mL无水乙醇、10 mL蒸馏水、2 mL 10%氢氧化钠溶液，混匀后置 85℃水浴中分散至溶液清亮。冷却后用蒸馏水定容。

2. 吸取样品液 1.00 mL，加 40 mL蒸馏水，然后按绘制标准曲线的方法进行操作，测出样品液的消光度。

3. 将测得的样品液消光度对照标准曲线，即可计算直链淀粉和支链淀粉质量分数。

（四）结果计算

$$\text{直链淀粉质量分数（干基）}=\frac{A\times 100}{m\times(1-\text{水分含量})}\times 100\%$$

$$\text{支链淀粉质量分数（干基）}=\frac{B\times 100}{m\times(1-\text{水分含量})}\times 100\%$$

式中：m——试样重量，mg

A——从标准曲线上查得直链淀粉量，mg

B——从标准曲线上查得支链淀粉量，mg

若有待测样品为直链淀粉和支链淀粉纯品，则方法中直链淀粉与支链淀粉的提取与分离可以省略。

淀粉测定的方法很多，可依据实验条件选择适宜的测定方法。

四、作业思考题

1. 写出样品测定的主要程序。
2. 旋光法测定淀粉含量操作中应注意什么？
3. 直链、支链淀粉含量与谷类品质的关系如何？

（高荣岐）

实验 27　植物脂肪含量的测定（索氏提取法）

油脂是一大类天然有机化合物，是人类食物的三大营养成分之一。测定脂质物质大多数采用低沸点有机溶剂萃取的方法。常用的溶剂有乙醚、石油醚、氯仿-甲醇等，其中乙醚溶解脂肪的能力强。因此，本实验选用无水乙醚作提取剂。用乙醚等有机溶剂浸提的物质除脂肪外，还有游离脂肪酸、磷脂、蜡、色素及脂溶性维生素等类似脂肪的物质，称为粗脂肪。有些样品的部分脂肪与矿物质、蛋白质和糖类结合，乙醚等溶剂不能破坏其结合键。为了能浸提出这部分脂肪，浸提前需酸水解。高脂肪含量的样品还需要预浸提。样品经酸水解后用石油醚和乙醇的混合物提取，可得到游离及结合脂肪总量，即全脂肪。本实验只进行粗脂肪的测定。

一、试材及用具

1. 试材

洁净的禾谷类粮食和豆类（花生除外）试样 30～50 g，磨碎后通过直径 1.0 mm圆孔筛装入广口瓶内备用。

2. 用具

分析天平（感量 0.000 1 g）、电热恒温箱、电热恒温水浴锅、粉碎机、研钵、备有变色硅胶的干燥器、滤纸筒、索氏抽提器一套（各部件必须洗净，用 105 ℃温度烘干，其中抽提瓶烘至恒重）、广口瓶、脱脂棉、脱脂线及脱脂细砂等。

3. 试剂

无水乙醚（AR）。

二、方法步骤

（一）试样处理

从备用的样品中，用烘盒称取 2～5 g试样，在 105 ℃温度下烘 30 min，趁热倒入研钵中，加入约 2 g脱脂细砂一同研磨。将试样和细砂研到出油状后，干净地转入滤纸筒内（筒底塞一层脱脂棉，并在 105 ℃温度下烘 30 min），用脱脂棉蘸少量乙醚揩净研钵上的试样和脂肪，并入滤纸筒内，最后再用脱脂棉塞入上部，压住试样。

（二）抽提与烘干

将抽提器安装妥当，然后将装有试样的滤纸筒置于抽提筒内，同时注入乙醚至虹吸管高度以上，待乙醚流净后，再加入乙醚至虹吸管高度的 2/3处。用一小块脱脂棉轻轻地塞入冷凝管上口，打开冷凝管进水管，开始加热抽提。加热的温度以每分钟回流的乙醚在 120～150滴，每小时回流 7次以上为宜。抽提的时间须视试样含油量而定，一般在 8 h以上，抽提至抽提管内的乙醚用玻璃片检查（点滴试验）无油迹为止。

抽净脂肪后，用长柄镊子取出滤纸筒，再加热使乙醚回流 2次，然后回收乙醚，取下冷凝管和抽提筒，加热除尽抽提瓶中残余的乙醚，用脱脂棉蘸乙醚揩净抽提瓶外部，然后将抽提瓶在 105 ℃温度下先烘 90 min，再烘 20 min，烘至恒重为止（前后两次重量差在 0.000 2 g以内即视为恒重），抽提瓶增加的重量即为粗脂肪的重量。

（三）结果计算

粗脂肪湿基质量分数、干基质量分数和标准水分下质量分数分别按公式（1），（2）和（3）计算：

$$\text{粗脂肪质量分数（湿基）}=\frac{m_1}{m}\times 100\% \quad \cdots\cdots (1)$$

$$\text{粗脂肪质量分数（干基）}=\frac{m_1}{m(1-M)}\times 100\% \quad \cdots\cdots (2)$$

$$\text{粗脂肪质量分数（标准水分下）}=\frac{m_1(1-M_{标})}{m(1-M)}\times 100\% \quad \cdots\cdots (3)$$

式中：m_1 ——粗脂肪重量，g

m ——试样重量，g

M ——试样水分含量，%

$M_{标}$——试样标准水分、标准杂质之和，%

双试验结果允许差：粮食、油料不超过 0.4%，大豆不超过 0.2%。求其平均数，即为测定结

果。测定结果取小数点后 1位。

注:如无现成的滤纸筒,可取长 28 cm,宽 17 cm的滤纸,用直径 2 cm的试管,沿滤纸长方向卷成筒形,抽出试管至纸筒高的一半处,压平抽空部分,折过来,使之紧靠试管外层,用脱脂线系住,下部的折角向上折,压成圆形底部,抽出试管,即成直径 2.0 cm,高 7.5 cm的滤纸筒。

测定试样中的脂质含量,过去普遍采用以乙醚为溶剂的索氏提取法,这种方法至今仍被认为是测定多种生物样品脂质含量的代表性方法。近年来,用 HPLC(高效液相色谱)和 NIR(近红外仪)等仪器测定谷物脂肪和脂肪酸含量的方法已经成熟。高效液相色谱分析法是经典柱色谱分析法,首先将脂肪用碱水解,得到组成脂肪的各种脂肪酸的混合物,再用 HPLC仪将这种混合物分离成一个个单一种类的脂肪酸,然后逐一进行定量测定。NIR法是根据脂质特殊的近红外吸收光谱(“身份”带),建立的测定脂质物质的一种方法。HPLC,NIR和自动脂肪检测仪法具有分离性能好,速度快,灵敏度高,结果准确,操作自动化的突出优点。

三、作业思考题

1. 什么是粗脂肪和全脂肪?测定全脂肪时需要增加的预处理步骤是什么?
2. 不同植物材料、不同脂质物质测定方法是否一样?

(田纪春)

实验 28　植物可溶性糖含量的测定

可溶性糖包括葡萄糖、果糖、蔗糖,是植物品质的重要构成性状之一,尤其是以果实为目的产品的果树作物,可溶性糖与酸的含量及其配比是影响果实风味品质的重要因素。对于鲜食品种,一般来讲,高糖中酸,风味浓,品质优;低糖中酸,风味淡,品质差。因此,可溶性糖的定量研究对果树的品质育种具有重要意义。

一、试材及用具

1. 试材

新鲜或冷冻的植物材料。

2. 用具

高速组织捣碎机、电热恒温水浴锅、1 000 W 调温电炉以及 200 mL、250 mL容量瓶、250 mL锥形瓶及 50 mL碱式滴定管等。

3. 试剂

主要包括费林试剂及亚甲基蓝溶液。

二、原理

主要原理:在加热条件下,用还原糖溶液滴定一定量的费林试剂,还原糖将费林试剂中的二价铜还原为一价铜,以亚甲基蓝为指示剂,稍过量的还原糖立即使蓝色的氧化型亚甲基蓝还原为无色的还原型亚甲基蓝。通过实验,学习并掌握用费林试剂滴定法测定可溶性糖的原理和方法。

三、方法步骤

（一）试剂配制

1. 费林试剂甲

称取硫酸铜（$CuSO_4 \cdot 5H_2O$，分析纯）34.6 g溶于水中，稀释至500 mL，过滤，贮于棕色瓶内。

2. 费林试剂乙

称取氢氧化钠 50 g和酒石酸钠钾（$KNaC_4O_6H_4 \cdot 4H_2O$，分析纯）138 g溶于水中，稀释至500 mL，用石棉垫漏斗抽滤。

3. 转化糖标准溶液

称取 9.5 g蔗糖（分析纯），用水溶解后转入 1 000 mL容量瓶中，加入 6 mol/L HCl（分析纯）10 mL，加水至 100 mL。在 20～25℃下放置 3 d或在 25℃保温 24 h，然后用水定容（此为酸化的1%转化糖液，可保存 3～4个月）。测定时，取 1%转化糖液 25.00 mL放入 250 mL容量瓶中，加入甲基红指示剂一滴，用 1 mol/L NaOH溶液中和后用水定容，即为 1 mg/mL转化糖标准溶液。

4. 亚甲基蓝溶液

称取 0.5 g亚甲基蓝（分析纯）溶于 10 mL水中。

5. 乙酸锌溶液

称取 21.9 g乙酸锌［$Zn(OAc)_2 \cdot 2H_2O$，分析纯］溶于水中，加冰乙酸 3 mL稀释至 100 mL。

6. 亚铁氰化钾溶液

称取 10.6 g亚铁氰化钾［$K_4Fe(CN)_6 \cdot 3H_2O$，分析纯］溶于水，稀释至 100 mL。

（二）样品提取液制备

取待测样品适量，洗净，用不锈钢刀将可食部分切成适当小块，充分混匀后，按四分法取样。称取 100 g鲜样加入等质量的水，放入组织捣碎机中捣成 1∶1匀浆，有些材料匀浆比例可适当调整，多汁果蔬类可直接捣浆。称取匀浆 25.0 g或 50.0 g（相当于样品 12.5 g或 25.0 g）放入 150 mL烧杯中，含有机酸较多的材料加 0.5～2.0 g粉状 $CaCO_3$ 调至中性（广泛试纸检试）。用水将样液全部转入 250 mL容量瓶中，并调整体积约为 200 mL。置（80±2）℃水浴保温 30 min，期间摇动数次，取出后加入乙酸锌溶液及亚铁氰化钾溶液各 2～5 mL，冷却至室温后，用水定容，过滤备用。

取已经制备的待测液 100 mL于 200 mL容量瓶中，加 6 mol/L HCl 10 mL。在（80±2）℃水浴加热 10 min，放入冷水槽中冷却后，加甲基红指示剂 2滴用 6 mol/L及 1 mol/L NaOH溶液中和，用水定容。

（三）可溶性总糖测定

1. 费林试剂的标定

取费林试剂甲、乙各 5.00 mL或在测定前先等体积混合后取 10.00 mL混合液于 250 mL锥形瓶中，放入玻璃珠 4～5粒，先加入比预测（预测见 2）仅少 0.5 mL的 1 mg/mL转化糖标准液。将此混合液置 1 000 W电炉上加热，使其在 2 min左右沸腾，准确煮沸 2 min，此时不离开电炉，立即加入 0.5%亚甲基蓝指示剂 2～3滴，并继续以每滴 4～5 s的滴速滴加标准糖液，直至二价铜离子完全被还原生成砖红色氧化亚铜沉淀，溶液蓝色褪尽为终点。用准确滴定标准糖液的体积 V_1（mL），乘以标准糖液质量浓度（mg/mL），即得 10 mL费林试剂所相当的糖的质量（mg）。

2. 预测

取费林试剂甲、乙各 5.00 mL或 10.00 mL混合液于 250 mL锥形瓶中，由滴定管加入待测糖液约 15 mL，在电炉上加热至沸腾，约沸腾 15 s后迅速滴加待测糖液，至呈现极轻微的蓝色为止，此时加入 0.5%亚甲基蓝指示剂 2～3滴，继续滴加待测糖液，直至溶液蓝色褪尽为止，记下待测糖液的用量 V_2（mL）。

3. 准确测定

取费林试剂甲、乙各 5.00 mL或 10.00 mL混合液加入锥形瓶中，由滴定管加入比预测仅少 0.5 mL的待测糖液，并补加 V_1-V_2 的水（标准费林试剂所消耗的标准糖液体积 V_1 减去预测消耗的待测糖液体积 V_2，即为应补加水的体积），使其与标定费林试剂时的反应体积一致。以下按费林试剂标定同样操作，继续滴至终点。前后沸腾时间须在 3 min左右。待测糖液消耗量应控制在 15～50 mL范围内，不能大于标定费林试剂所用标准糖液体积 V_1，否则应增减称样量重新制备待测液。同法平行操作 3次，取平均值。

（四）结果计算

可溶性总糖质量分数（以转化糖计）＝（G/V）×（A/m）×（250/1 000）×100%

式中：m——样品质量，g

G——10 mL费林试剂相当的转化糖，mg

V——准确滴定时所用待测液的体积，mL

A——稀释倍数

250——定容体积，mL

1 000——由毫克换算为克

四、作业思考题

1. 为什么整个滴定过程必须使溶液处于沸腾状态？
2. 滴定时样品溶液预测有何作用？
3. 滴定过程中影响测定结果的主要操作因素是什么？

（陈美霞）

实验 29　植物可滴定酸的测定

植物可滴定酸度是植物品质的重要构成性状之一，尤其是以果实为目的产品的果树作物，可滴定酸与糖一样，是影响果实风味品质的重要因素。对于鲜食品种，一般来讲，高糖中酸，风味浓，品质优；对于加工品种，则要求高糖高酸。因此，可滴定酸的定量研究对果树的品质育种具有重要意义。

一、试材及用具

1. 试材

新鲜或冷冻的植物材料。

2. 用具

高速组织捣碎机（10 000～12 000 r/min）、电子天平（感量 0.01 g）、电热恒温水浴锅、50 mL

移液管、100mL、60 mL烧杯、250 mL容量瓶、7 cm漏斗、250 mL锥形瓶、50 mL碱式滴定管等玻璃仪器及 12.5 cm快速滤纸等。

3. 试剂

0.1 mol/L氢氧化钠标准溶液、酚酞指示剂（10 g/L的 95%乙醇溶液）等。

二、原理

主要原理：试样浸出液以酚酞为指示剂，用 0.1 mol/L氢氧化钠标准溶液滴定。本实验用水应是不含二氧化碳的或中性蒸馏水，可在使用前将蒸馏水煮沸，放冷，或加入酚酞指示剂用 0.1 mol/L氢氧化钠溶液中和至出现微红色。有些果蔬样液滴定至接近终点时出现黄褐色，这时可加入样液体积的 1～2倍热水稀释，加入酚酞指示剂 0.5～1 mL，再继续滴定，使酚酞变色易于观察。

实验目的是通过实验，学习并掌握用指示剂滴定法测定样品可滴定酸的原理和方法。

三、方法步骤

（一）样品提取液制备

剔除试样的非可食部分（冷冻制品预先在加盖的容器中解冻），用四分法分取可食部分切碎混匀，称取 250 g准确至 0.1 g放入高速组织捣碎机内，加入等量水，捣碎 1～2 min。每 2 g匀浆折算为 1 g试样，称取匀浆 50～100 g准确至 0.1 g用 100 mL水洗入 250 mL容量瓶中，置 75～80 ℃水浴上加热 30 min，期间摇动数次，取出冷却，加水至刻度，摇匀过滤。

（二）测定

根据预测酸度，用移液管吸取 50 mL或 100 mL样液，加入酚酞指示剂 5～10滴，用氢氧化钠标准溶液滴定，至出现微红色且 30 s内不褪色为终点，记下所消耗的体积。

（三）结果计算

1. 试样的可滴定酸度以每 100 g或 100 mL中氢离子物质的量（mmol）表示，按下式计算：

可滴定酸度 [mmol/100g(mL)] = [(c×V_1) /V_0] × [250 /m (V)] ×100

式中：——氢氧化钠标准溶液物质的量浓度

V_1——滴定时所消耗的氢氧化钠标准溶液体积，mL

V_0——吸取滴定用的样液体积，mL

m (V)——试样重量，g或体积，mL

250——试样浸提后定容体积，mL

2. 试样的可滴定酸度以某种酸的质量分数或体积分数表示，按下式计算：

可滴定酸度 = [(c×V_1 ×k) /V_0] × [250 /m (V)] ×100%

式中：k——换算为某种酸的质量（g）的系数，见表 4－4

其余符号同上式

表 4－4 几种酸的换算系数（k）

酸的名称	换算系数（k）	习惯用以表示的果蔬制品
苹果酸	0.067	仁果类、核果类水果
结晶柠檬酸（一个结晶水）	0.070	柑橘类、浆果类水果

续表

酸的名称	换算系数（k）	习惯用以表示的果蔬制品
酒石酸	0.075	葡萄
草酸	0.045	菠菜
乳酸	0.090	盐渍、发酵制品
乙酸	0.060	醋渍制品

四、作业思考题

1. 为何本实验所用的蒸馏水应不含二氧化碳？应如何操作？

2. 在可滴定酸含量测定过程中，应注意哪些问题？

（陈美霞）

实验 30　植物维生素 C 含量的测定

维生素 C又称抗坏血酸，是果实中重要组成成分，人体缺乏它就会患坏血病。但人体中不能合成维生素 C，所需要的维生素 C，必须从植物产品中获取。因此，植物产品维生素 C含量的测定是植物产品品质，特别是果蔬产品品质的重要指标。

一、试材及用具

1. 试材

鲜草莓、鲜枣或干枣。

2. 用具

恒温箱、紫外 —可见分光光度计、高速组织捣碎机、烘箱以及移液管、烧杯及容量瓶等玻璃器皿。

3. 试剂

⑴ 4.5 mol/L H_2SO_4

将 250 mL H_2SO_4（相对密度 1.84）加入 700 mL水中，冷却后再用水稀释至 1 000 mL。

⑵ 85% H_2SO_4

将 900 mL H_2SO_4（相对密度 1.84）加入 100 mL水中。

⑶ 2% 2，4 —二硝基苯肼溶液

将 2，4—二硝基苯肼 2 g溶解于 100 mL 4.5 mol/L H_2SO_4 内，过滤。不用时存于冰箱内，每次用前必须过滤。

⑷ 2%草酸溶液

将 20 g草酸溶解于 700 mL水中，稀释至 1 000 mL。

⑸ 1%草酸溶液

稀释 500 mL 2%草酸溶液到 1 000 mL。

⑹ 1%硫脲溶液

将 5 g硫脲溶解于 500 mL 1%草酸溶液中。

⑺ 2%硫脲溶液

将 10 g硫脲溶解于 500 mL 1%草酸溶液中。

⑻ 1 mol/L HCl

取 100 mL HCl(12 mol/L)加入水中,并稀释至 1 200 mL。

⑼ 抗坏血酸标准溶液

将 100 mg纯抗坏血酸溶解于 100 mL 1%草酸中,配成 1 mL相当于 1 mg抗坏血酸的溶液。

⑽ 活性炭

将 100 g活性炭加到 750 mL 1 mol/L盐酸中,回流 1～2 h,过滤,用水洗数次,至滤液中无铁离子(Fe^{3+})为止,然后置于 110 ℃烘箱中烘干。

⑾ 检验铁离子方法

利用普鲁士蓝反应。取上述滤出液数滴,加入 1 mL 2%亚铁氰化钾与 1% HCl等量混合液中,如有铁离子则产生蓝色沉淀。

二、原理

总抗坏血酸包括还原型、氧化型和结合型,样品中还原型抗坏血酸经活性炭氧化为氧化型抗坏血酸,再与 2,4—二硝基苯肼作用生成红色脎,根据脎在硫酸溶液中的含量与总抗坏血酸的含量成正比,进行比色定量。实验全过程中应避光。

实验目的是学习并掌握用比色法测定维生素 C的原理和方法。

三、方法步骤

㈠ 样品的制备

1. 鲜样制备

称 100 g鲜样和 100 g 2%草酸溶液,倒入高速组织捣碎机中打成匀浆,取 10～40 g匀浆(含 1～2 g抗坏血酸)倒入 100 mL容量瓶内,用 1%草酸溶液稀释至刻度,混匀。

2. 干样制备

称 1～4 g干样(含 1～2 g抗坏血酸)放入研钵内,加入 1%草酸溶液磨成匀浆,倒入 100 mL容量瓶内,用 1%草酸溶液稀释至刻度,混匀。

3. 过滤

将 1或 2液过滤,滤液备用。不易过滤的样品可离心除去沉淀,取上清液备用。

㈡ 氧化处理

取 25 mL上述滤液,加入 2 g活性炭,振摇 1 min,过滤,弃去最初数毫升滤液。取 10 mL经氧化的提取液,加入 10 mL 2%硫脲溶液,混匀。

㈢ 呈色反应

1. 于 3支试管中各加入 4 mL上述溶液。1支试管作为空白,在其余试管中加入 1.0 mL 2% 2,4—二硝基苯肼溶液,将所有试管放入(37±0.5)℃恒温箱或水浴中,保温 3 h后取出,除空白管外,将所有试管放入冰水中。空白管取出后使其冷到室温,然后加入 1.0 mL 2% 2,4—二硝基苯肼溶液,在室温中放置 10～15 min后放入冰水内。

2. 85%硫酸处理:当试管放入冰水后,向每一试管中慢慢滴加入 5 mL 85%硫酸,需边加入

边摇动试管。将试管从冰水中取出在室温放置 30 min后测定光密度值。

（四）测定

用 1 cm比色杯，以空白液调零点，于 500 nm波长处测 OD值。

（五）标准曲线绘制

1. 加 2 g活性炭于 50 mL抗坏血酸标准溶液中，摇动 1 min，过滤。

2. 取 10 mL滤液放入 500 mL容量瓶中，加 5.0 g硫脲，用 1%草酸溶液稀释至刻度（抗坏血酸质量浓度 20 μg/mL）。

3. 取 5 mL，10 mL，20 mL，25 mL，40 mL，50 mL，60 mL稀释液，分别放入 7个 100 mL容量瓶中，用 1% 硫脲溶液稀释至刻度，使最后稀释液中抗坏血酸的质量浓度分别为 1 μg/mL，2 μg/mL，4 μg/mL，5 μg/mL，8 μg/mL，10 μg/mL，12 μg/mL。

4. 按样品测定步骤形成脎并比色测定。

5. 以 OD值为纵坐标，以抗坏血酸质量浓度（μg/mL）为横坐标绘制标准曲线。

（六）结果计算

抗坏血酸的含量（mg/100g）＝（C×V/m）×F×（100/1 000）

式中：C——由标准曲线查得或由回归方程算得样品氧化液中总抗坏血酸的质量浓度，μg/mL

V——试样用 1%草酸溶液定容的体积，mL

F——样品氧化处理过程中的稀释倍数

m——试样质量，g

四、作业思考题

1. 哪些物质中含有较多的维生素 C?

2. 简述维生素 C的生理作用。

（陈美霞）

实验 31　植物维生素 A的提取和含量测定

维生素 A是一种人体重要的微营养素，影响正常的视觉功能、生长发育、铁代谢等。但人自身不能合成维生素 A，所需维生素 A必须从植物食品中获取。因此，植物产品中，特别是果蔬中的维生素 A的含量，是产品质量的重要指标。

一、试材及用具

1. 试材

胡萝卜。

2. 用具

分光光度计、索氏抽提器、电热恒温水浴锅、高速组织打浆机以及刻度吸管（1 mL，2 mL，5 mL，10 mL）、球形冷凝器（磨口，300 mm）及分液漏斗（250 mm）等。

3. 试剂

无水乙醇（AR）、乙醚（AR）、氯仿（AR）、20% ～25% 三氯化锑、标准维生素 A、酚酞、80%

KOH、浓氨水 (25% ～28%，AR)、无水硫酸钠 (AR)、焦性没食子酸 (AR)及乙酸酐等。

二、原理

维生素 A是脂溶性维生素，在氯仿溶液中可与三氯化锑生成不稳定的蓝色，称为 Carr－Price反应。蓝色溶液在 620 nm处有一吸收高峰。蓝色的深浅程度与维生素 A的含量成正比。利用比色法可测知样品维生素 A含量。由于所生成的蓝色物质不稳定，因而必须在 6 s内比色完毕。

三氯化锑遇微量水分即可形成氯氧化锑 (SbOCl)，不再与维生素 A起反应，因此本实验中所使用的仪器及试剂必须绝对干燥。为了吸收可能混入反应液中的微量水分，可向反应液中加 1～2滴醋酸酐。维生素 A极易被阳光破坏，实验中应避免强光照射。三氯化锑腐蚀性强，不得用手直接接触。用过的器皿先用稀盐酸浸泡后再清洗。

本实验学习和掌握维生素 A的提取和定量测定方法。

三、方法步骤

(一) 试剂的配制与纯化

1. 无水乙醇 (AR)

需经脱醛处理。取 2 g $AgNO_3$ 溶于少量蒸馏水中，4 g NaOH溶于温乙醇中，将二者倾于 1 L乙醇中，摇匀，静置 1～2 d，取上层乙醇蒸馏。最初 50 mL馏分弃去，收集的馏分应做含醛检查：取 2 mL氧化银氨溶液 (加浓氨水于质量浓度 50% $AgNO_3$ 中，直至沉淀全部溶解；加数滴质量浓度 10% NaOH，如果还有沉淀，应再加氨水使其溶解)，加几滴蒸出的乙醇，摇匀，加少量 10% NaOH，加热，如没有银沉淀表示没有醛，否则将发生银镜反应。

2. 乙醚 (AR)

不得含有过氧化物，以免维生素 A被破坏。过氧化物检验方法：取 5 mL乙醚，加 1 mL 50% KI，振荡 1 min，如水层呈黄色或加 1滴淀粉后显蓝色，则证明乙醚中含过氧化物，必须重新蒸馏，直至无过氧化物。具体处理方法是：将乙醚放入分液漏斗，先以 1/5乙醚量的稀 KOH溶液洗涤 2～3次，以除去乙醇；然后用盐酸酸化，加入 1/5乙醚量的 $FeSO_4$ 或 Na_2SO_3 溶液，振摇，静置，分层后弃去下层水溶液，以除去过氧化物；最后用水洗至中性，用无水 $CaCl_2$ 或无水 Na_2SO_4 脱水，并进行重蒸馏。

3. 氯仿 (AR)

氯仿分解产物可破坏维生素 A，检查的方法是：在试管中加少量氯仿和水，振荡，加几滴 $AgNO_3$ 溶液，如水层出现白色沉淀，说明氯仿中有分解产物。这时，可在分液漏斗中加水洗涤氯仿数次，再加无水硫酸钠脱水蒸馏。

4. 20% ～25%三氯化锑

用减量法称取 20～25 g干燥的三氯化锑，溶于 100 mL氯仿中，加少许无水硫酸钠，贮存于棕色瓶中，盖严，尽量避免有吸收水分的机会。

5. 标准维生素 A

取维生素 A乙酸酯 (BC) 0.115 g溶于 100 mL氯仿中。此液为 1 mg/mL维生素 A贮备液，使用时将其稀释为 1 μg/mL维生素 A的操作液。

6. 酚酞

1 g酚酞溶于 100 mL 95% 乙醇中。

（二）样品处理

取捣碎的胡萝卜 5～10 g加水 40 mL，搅匀，移入分液漏斗中，加浓氨水 5 mL，乙醇 30 mL摇匀。然后用乙醚抽提，每次用量为 40 mL，共抽提 3次。收集乙醚层，醚层用水（每次 100 mL）洗涤，共 3次。将 3次水层合并，用 30 mL乙醚抽提一次。合并所有的醚层，于索氏抽提器中除去乙醚。

（三）皂化

向除尽乙醚的瓶中加 30 mL 80% 的氢氧化钾及 40 mL无水乙醇，0.8 g焦性没食子酸，（83±1 ℃）水浴上皂化约 30 min。皂化时间因样品而异。检查是否皂化完全，可向皂化瓶内加少量水，振摇，如有混浊现象，表示皂化不完全，应继续加热回流；反之，则表示皂化已完全。

（四）提取

将皂化液转入分液漏斗中，加 50 mL水，用 40 mL乙醚分 3次提取皂化液。合并乙醚提取液，并用蒸馏水（每次 100 mL）洗涤醚层至水呈中性，弃去水层。醚层定容到一定体积，并用无水硫酸钠除去水分后进行测定。

（五）除去溶剂

取一定量（2～5 mL）醚提取液，在真空下除去乙醚，残渣立即加入 5 mL氯仿，并转入刻度具塞试管定容至 10 mL。此液供比色测定用。

（六）样品的测定

取 1 mL样品的氯仿液放入内径为 1 cm的比色杯中，加 1滴醋酸酐，另取 1 mL氯仿放入内径为 1 cm的比色杯中，加 1滴醋酸酐作空白对照液。先在空白液比色杯中加 3 mL三氯化锑氯仿液，用细玻璃棒迅速搅拌均匀，立即置分光光度计中，620 nm处调整分光光度计零点，然后在样品比色杯内加入 3 mL三氯化锑氯仿液，用细玻璃棒搅拌均匀，立即放入分光光度计中读取吸光度。按样品的吸光度从标准曲线上查出维生素 A含量。

（七）标准曲线的绘制

取维生素 A标准液 0 mL，1.0 mL，2.0 mL，3.0 mL，4.0 mL，5.0 mL，按照步骤（六）所述，测出各吸光度，以维生素 A含量为横坐标，吸光度为纵坐标，绘制出标准曲线。

（八）结果计算

$$\text{维生素 A含量（mg/100 g样品）}=\frac{C\times F\times V}{m\times 1\ 000}\times 100$$

式中：C——从标准曲线上查得的维生素 A含量，μg/mL

F——样品稀释倍数

m——样品质量，g

V——试样用氯仿定容的体积，mL

四、作业思考题

1. 维生素 A在提取过程中应注意什么问题？

2. 根据当地的试材情况，设计一种植物产品的维生素 A含量测定方案。

（陈美霞）

实验 32　植物维生素 E含量测定

维生素 E对人体有抗衰老、防肿瘤等效应，测定维生素 E的方法有荧光法、分光光度法及液相色谱法等。维生素 E的正己烷溶液用 E_x 297 nm波长激发，产生 E_x 327 nm波长荧光。在一定浓度范围内，荧光强度与维生素 E浓度呈线性关系。

本实验学习荧光法测定维生素 E的含量。

一、试材及用具

1. 试材

茶叶磨碎试样。

2. 用具

荧光分光光度计、索氏脂肪抽提器及减压浓缩装置等。

3. 试剂

⑴ 95%乙醇

1 000 mL加 4 g高锰酸钾、2 g氢氧化钾于蒸馏瓶中，80 ℃水浴上熏蒸。

⑵ 60%氢氧化钾乙醇液。

⑶ 正己烷。

⑷ 乙醚。

⑸ 无水硫酸钠。

⑹ 聚乙烯吡咯烷酮。

⑺ 硫酸。

⑻ 6%乙醇液。

⑼ 维生素 E标准液 (mg/mL)

称取 0.100 0 g标准维生素 E (99%纯度)用正己烷溶解并定容至 100 mL，根据需要可将维生素 E标准液稀释成所需浓度，用时现配。

二、方法步骤

(一) 提取液制备

1. 浸提及皂化

磨碎茶样，过 60目筛，称取 0.30 g放入洗净的索氏瓶，加 20 mL 6%乙醇液、5 mL 60%氢氧化钾乙醇液，摇匀 30 s，在 70 ℃水浴上加热 10 min，流水下快速冷却皂化液。

2. 萃取

上述皂化液加 40 mL蒸馏水、40 mL乙醚，萃取皂化物，摇匀静置 20～30 min，离心 5 min (2 000 r/min)，下层再加 40 mL乙醚萃取。合并乙醚层于分液漏斗中，加等量水洗乙醚层 2～3次至乙醚层呈中性。过无水硫酸钠柱，以除去水分。

3. 浓缩

减压浓缩乙醚萃取液 (绝氧)，加正己烷溶解浓缩物并定容至 10 mL。

4. 纯化

取正己烷溶液 3 mL,加 0.2 mL 80% 硫酸,摇匀 3～5 s,排除类胡萝卜素、维生素 C干扰。加 2 mg聚乙烯吡咯烷酮,摇 30 s后离心 (2 000 r/min,10 min),排除多酚类物质的干扰。离心后上层液为供试液。

(二) 荧光定性定量测定

迅速取供试液 1.5 mL加入 1 cm石英荧光测量池。若维生素 E浓度过大,需稀释。仪器测试条件:激发波长 (E_X) 295 nm,发射波长 (E_m) 327 nm,激发通带 5.0 nm,发射通带 5.0 nm,扫描速度 60 nm/min。测样品荧光强度,以试剂作空白。

(三) 标准曲线制作

以正己烷为溶剂,将维生素 E标液稀释成质量浓度 2 μg/mL,4 μg/mL,6 μg/mL,8 μg/mL,10 μg/mL,12 μg/mL系列,在 E_X 327 nm条件下测其荧光强度。以扣除正己烷荧光强度后的荧光强度为纵坐标,维生素 E质量浓度为横坐标,作出标准曲线图。得回归方程:y=0.162 x+0.055,r=0.999 6。回归方程随仪器灵敏度不同有变。

(四) 结果计算

茶样维生素 E含量 (mg/100g) =n×Y/m

式中:——稀释倍数

m——样品干重,g

Y——标准曲线查得的质量浓度,μg/mL

三、作业思考题

1. 维生素 E对人体有何生理作用?

2. 在维生素 E测定过程当中,应注意哪些问题?

(陈美霞)

实验 33　植物芳香物质的提取分离及测定

芳香物质是具挥发性的、能够产生一定气味的含香物质的总称,它是构成和影响果品鲜食、加工质量的主要因素。到目前为止,已从杏果实中鉴定出 100多种芳香物质。芳香物质分析一般要经过芳香物质的提取、纯化、浓缩、气相色谱分离并配合质谱定性定量。为了得到较全面的分析,往往需要同时使用几种提取方法。

加热果汁,使之在 100℃以下沸腾,产生二次蒸气,夹带芳香物质从果汁中分离出来,然后用有机溶剂从中回收挥发性物质,挥发性物质在溶剂相和蒸馏液之间的分配系数不同,通过溶剂的选择,排除那些不重要或干扰分析的化合物,有选择性地提取芳香物质。同时蒸馏萃取法是蒸馏提取和溶剂提取的合并,同时加热果汁和溶剂,两种蒸气混在一起后完成萃取工作。它吸收了二者的优点,并且只需少量的溶剂就可有效地提取大量样品中的挥发性成分。经提取、纯化、浓缩的精油,采用气相色谱 —质谱 —计算机联用技术进行分离鉴定。通过检索谱图库,并结合标准质谱图,确认化学成分,运用峰面积归一化法或内标法,求得各化学成分的含量。

本实验以杏果实为试材,学习芳香物质的提取分离及测定方法。

一、试材及用具

1. 试材

杏果实。

2. 用具

气相色谱－质谱－计算机联用仪（Agilent6890N－5973N型）、同时蒸馏萃取装置（SDE）、电热恒温水浴锅及套式恒温加热装置等。

3. 试剂

正己烷、无水硫酸钠（AR）及 3－壬酮等。

二、方法步骤

（一）果实芳香物质的提取

采用同时蒸馏萃取法，装置见图 4－4。A瓶中装有样品和蒸馏水，B瓶中装有正己烷或其他有机溶剂，两部分加热后，各自的蒸气在装置的顶部混合，并通过冷凝管冷却，在 EF段分层，有机层从 D端返回 B瓶，水层从 C端返回 A瓶，这样便完成了整个萃取过程。如此连续进行，使样品中的挥发性有机物萃取浓缩。

称取杏果肉 500 g打浆后置于 3 L圆底烧瓶中，加入内标物 3－壬酮（最终浓度为 0.7 μg/g），加入 1 L蒸馏水；于 250 mL圆底烧瓶中加正己烷 60 mL。将 SDE装置安装好，用套式恒温器加热，保持微沸状态，连续蒸馏萃取 3 h。正己烷萃取液中加无水硫酸钠 5 g脱水干燥一昼夜，过滤。滤液浓缩至 0.2～0.4 mL，得到芳香物质浓缩液。待气相色谱－质谱测定。

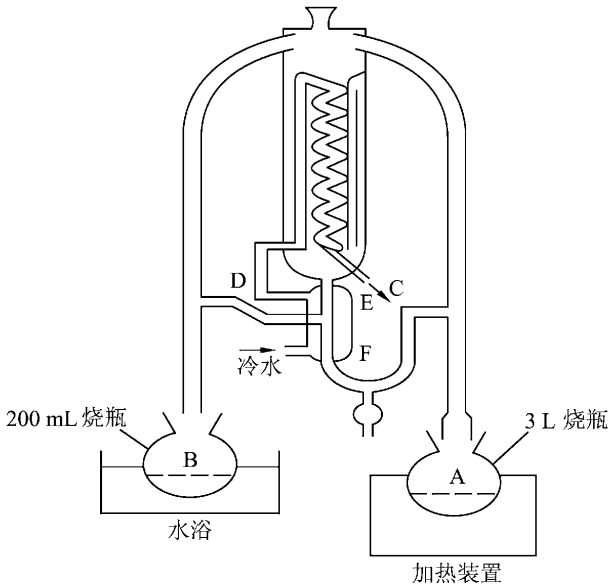


图 4－4　同时蒸馏萃取装置

（二）气相色谱—质谱测定

1. 气相色谱条件

色谱柱：HP—5弹性石英毛细管柱 25 m×0.25mm×0.1 μm，柱温 40 ℃以 2 ℃/min速度升温至 250 ℃，保持 40 min，气化室温度 270 ℃，进样量 0.2 μL，载气 He流量 1 mL/min，分流比 100∶1。

2. 质谱条件

GC—MS接口温度 280 ℃，EI离子源，离子源温度 230 ℃，电子能量 70 eV，质量范围 29～600 Amu。

（三）芳香物质的定性与定量

1. 定性分析

芳香物质组分分离大多数采用气相色谱法，不同组分形成其各自的色谱峰，按照色谱峰的保留值来定性。芳香物质成分的鉴定可用红外光谱、紫外光谱、毛细管色—质谱联用、核磁共振等方法。目前最广泛的是采用色—质谱联用法。

取芳香物质提取物 0.2 μL，用气相色谱—质谱—计算机联用仪进行分析鉴定。通过 G1701CA化学工作站数据处理系统，检索 Nist98/Wiley图谱，再结合有关文献进行人工谱图解析，确认芳香物质的各个化学成分。

2. 定量分析

⑴ 归一化法

应用归一化法时，必须将样品的全部组分馏出，并都能产生相应信号。计算公式为：

$$P_i = m_i / m \times 100\% = A_i f_i / (A_1 f_1 + A_2 f_2 + \cdots + A_n f_n) \times 100\%$$

式中：P_i——i组分的质量分数

m_i——被测组分 i的质量

m——被测物试样的总质量

A_i——i组分峰面积

f_i——相对校正因子

相对校正因子 f_i，即为物质 i和标准物质 S的绝对校正因子（f_i / f_s）之比，其定义是：被测物质单位峰面积所相当物质的量是标准物质单位峰面积相当物质的量的几倍。f_i可由文献中查得，也可以测得，测定方法：先准确称量标准物质和被测物，然后混合均匀进样，测出它们的峰面积，按下式计算：

$$f_i = f_i / f_s = (m_i / A_i) / (m_s / A_s)$$

通过 G1701CA化学工作站数据处理系统，按面积归一化法进行定量分析，求得各化学成分在挥发油中的质量分数。

⑵ 内标法

将各标准纯品配制成系列浓度梯度，加 3—壬酮 1.0 μL做内标，用正己烷定容至 10 mL，然后以各标准纯品与内标的峰面积之比值对相应标准物质的含量作标准曲线。根据标准纯品各自的标准曲线，按以下公式计算实际试样中芳香物质含量：

$$\text{芳香物质含量}\ (\mu g/g) = \frac{C \times V \times 10^3}{M \times L}$$

式中：　——从标准曲线上查得的含量，μg

V——芳香物质体积，mL

M——试样量，g

L——进样量，μL

三、作业思考题

1. 试测定比较不同类型杏果实芳香物质成分及含量的差异。
2. 试述杏果实芳香物质含量测定步骤。

（陈美霞）

实验 34　茶叶茶多酚类物质的测定

茶多酚是茶叶中的重要品质组成，含量多少与品种、栽培条件、加工方法有关，必须掌握其测定方法。酒石酸铁比色法，方法简便、快速，重现性好，容易掌握，已列为国家标准方法。

在一定的 pH 条件下，酒石酸铁与茶多酚类物质形成蓝紫色或红紫色的络合物，在波长 540 nm处比色，在适当的浓度范围内，茶多酚的量与呈色的深浅程度成正比，可用分光光度法定量。

本实验学习用酒石酸铁比色法测定茶多酚类物质的方法。

一、试材及用具

1. 试材

茶叶磨碎试样。

2. 用具

分光光度计、实验室常规玻璃仪器（三角瓶、漏斗、容量瓶、移液管及量筒等）。

3. 试剂

⑴ 酒石酸铁溶液

称取硫酸亚铁（$FeSO_4 \cdot 7H_2O$）1 g与酒石酸钾钠（$KNaC_4H_4O_6 \cdot 4H_2O$）5 g 加水溶解稀释至 1 L。该溶液可稳定 10 d。

⑵ pH7.5的磷酸缓冲液

先配制以下两种溶液：

a. 1/15 mol/L的磷酸氢二钠溶液

称取 11.876 g的 $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$，加水溶解，稀释至 1 L（若用无结晶水的需称取 9.47 g 若用含 12个结晶水的需称取 23.872 g 其余操作相同）。

b. 1/15 mol/L磷酸二氢钾溶液

称取经 110℃烘箱烘 2 h后的 KH_2PO_4 9.078 g 加水定容至 1 L。

取 a液 85 mL和 b液 15 mL混合后，即为 pH7.5的缓冲液。

二、方法步骤

（一）配制标准溶液

称取茶多酚纯品 0.250 0 g加水溶解定容至 250 mL，混匀，即为每毫升含 1 mg茶多酚的标准溶液。

（二）绘制标准曲线

分别称取标准溶液 0.0 mL，0.5 mL，1.0 mL，1.5 mL，2.0 mL于一组 25 mL棕色容量瓶中，各加水至 5 mL，再加酒石酸铁溶液 5 mL，加缓冲液至刻度，混匀后用 10 mm比色皿，以空白试剂作参比，于波长 540 nm处测定吸光度，绘制出标准曲线。

（三）茶汤制备

准确称取磨碎试样 3 g加 450 mL沸水，在沸水浴中浸提 45 min，每隔 10 min摇瓶一次，过滤。洗涤残渣，滤液合并于 500 mL容量瓶中，加水定容至刻度，摇匀。

（四）测定

准确吸取茶汤 1 mL，注入 25 mL容量瓶中，加水 4 mL，酒石酸铁溶液 5 mL，用缓冲液定容至刻度，混匀。用 10 mm比色皿，以空白试剂作参比，于波长 540 nm处测吸光度，从标准曲线查得溶液含茶多酚的质量。

（五）结果计算

$$\text{茶多酚含量} = \frac{C \times L_1}{M \times m \times L_2 \times 10^3} \times 100\%$$

$$\text{或茶多酚含量} = \frac{E \times 3.913}{1\,000} \times \frac{L_1}{M \times m \times L_2} \times 100\%$$

式中：C——从标准曲线查得测试液中茶多酚的质量，mg

E——测试液测得的吸光度

3.913——当吸光度等于 1.0时，每毫升试液中茶多酚的质量，mg

M ——试样量，g

m ——试样干物率，%

L_1 ——总试液量，mL

L_2 ——所取试液量，mL

三、作业思考题

1. 根据测定结果比较两个品种茶叶的茶多酚含量的差异。说明差异的原因并鉴定其品质的好坏。

2. 用此法测定茶多酚含量时应注意哪些问题？

（陈美霞）

第五章　植物抗性鉴定技术

实验 35　植物抗虫性鉴定

植物害虫是造成农业减产的重要因素之一，据联合国粮农组织统计，全世界每年因病虫害使谷物减产 20% ～30%，仅美国每年因虫害造成的皮棉损失就达 12% ～14%，经济损失达 45亿美元。传统的杀虫剂主要是一些天然或合成的化学药品，它们在短期内虽然能起到杀灭害虫保护农作物的作用，但长期使用会使毒性在植物体内积累，危害人类及其他动物健康，同时还能导致害虫对杀虫剂产生抗性，从而降低其药效，因此世界上很多国家都已禁止对农作物使用化学杀虫剂，而致力于生物杀虫剂的研究，并取得了重大进展。使用生物杀虫剂可以克服化学杀虫剂的许多弊端，但许多用作生物杀虫剂的物质在自然界并不是大量存在的，通常情况下只是作为一些次生代谢物存在，这使得生物杀虫剂的造价昂贵。采用基因工程等育种技术培育抗虫植物品种，是所有害虫防治策略中最经济有效的办法。它不仅对植物具有连续保护作用，而且只对目标害虫起作用，而对非危害生物无影响，所表达的抗虫物质仅存在于植物体内，不存在环境污染问题。因此，可以减少使用农药次数，降低生产费用，减轻环境污染和产品残毒，保持害虫与捕食天敌之间的自然平衡，把大田、果园、菜园及花园虫害减少到最低限度，具有重要意义。

本实验主要学习棉花蚜虫及棉花红铃虫抗性鉴定的方法及步骤。

一、内容说明

抗虫性鉴定（evaluation of insect resistance）是对植物品种、品系或种质对特定害虫抵抗能力作出正确评价，是抗虫育种的重要基础工作。抗虫性鉴定的具体做法因植物、害虫而异。目前应用比较多的有如下几种：

1. 田间自然鉴定法

在虫口密度较大的地区和年份采用，即依靠自然界发生的害虫群体鉴定不同种质材料的抗性程度。在鉴定期间，不喷施化学农药。

2. 田间接种虫源，增加危害压力法

在虫口发生较少的地区和年份采取，补充接种一定数量的虫源，以增加害虫对作物的危害压力，强化种质材料间的抗虫性差异。田间接种法，只适合于在植物种质材料范围较小，害虫飞翔能力较弱的情况下进行，要特别注意接种后对周围其他非鉴定作物的影响，接种的方法、数量、时间主要根据种质材料和害虫的不同种类分别进行。

3. 温室接种法

在温室条件下，将饲养的害虫接种到待鉴定植物，经过一定时间观察，从中筛选出抗虫性强的种质材料。因害虫及寄主种类不同，其饲养方法、接种方法和饲养器皿亦有不同。如 Knight

等（1962）所进行的苹果棉蚜鉴定方法，是将至少长有两片真叶的盆栽实生苗在温室进行筛选，从春季开始一直继续到整个夏季。在温室内易感虫的寄主植株上培养棉蚜蛹，或从已感虫的果园植株收集棉蚜的蛹。每次接种可用毛刷把至少 12个蛹刷在单个实生苗上，棉蚜群体在一些实生苗上不能成活时，需要在两年期间内，重新接种 10次以上，如果仍然不能成活，即可分离出抗蚜虫的品系。

4. 网室鉴定法

在田间建造的网室内种植被鉴定的种质材料，并接种一定数量的害虫，可将害虫控制在一定危害范围内。此法较为可靠，但成本高。

二、方法步骤

Ⅰ　棉花蚜虫抗性鉴定

主要根据我国棉花种质资源抗虫鉴定协作组（1986）公布的抗棉蚜统一鉴定方法，略有改动。

（一）鉴定公式

利用田间自然虫源，通过调查被害分级，最后以蚜害指数与对照品种相比较，评定不同材料对苗蚜和伏蚜的抗性程度。

（二）田间设计

选棉病发生较轻的田块，小区种植，不设重复。每小区 6行，行长 8 m，行距 0.7～0.8 m，株距 26 cm，共 180株，小区面积 33.6 m^2 左右。对照选非洲棉 E－40（抗性对照）和岱字 61（感性对照），每 20个材料种植一组对照。于当地适期播种，棉种不作任何防蚜药剂处理。其他栽培管理同一般大田，不增加任何特殊措施。

（三）调查时间与取样方法

在苗蚜发生期于三叶期、五叶期（发生高峰期）和七叶期分别进行三次调查；在伏蚜发生期，感性对照品种岱字 61的卷叶株率达 50%时（伏蚜高峰期）进行第一次调查，7 d后进行第二次调查。在第二次苗蚜调查后，随即用久效磷等农药防治一次蚜虫。

每小区取中间 4行，每行随机查 50株，苗蚜期的前两次调查以全株受害最重叶片、苗蚜期的第三次调查及伏蚜期的两次调查均以棉株顶部 5片叶中受害最重之叶片为标准叶，依据被害分级标准统计各级株数。

（四）分级标准与计算

级别	分级标准
1	无蚜虫，叶片平展
3	有蚜虫，叶片无受害
5	有蚜虫，受害最重叶片皱缩或微卷
7	有蚜虫，受害最重叶片卷曲达半圆或半圆以上，呈瓢形
9	有蚜虫，受害最重叶片完全卷曲，呈球形

$$\text{蚜害指数} = \frac{(\text{各级株数} \times \text{级别})}{50 \times 4} \times 100\%$$

（五）抗性评定

将苗蚜期前两次调查蚜害指数的平均值、苗蚜期第三次调查的蚜害指数以及伏蚜期两次调

查的蚜害指数的平均值分别和对照品种相比较，评定出各品种对苗蚜、伏蚜以及苗期受害后恢复能力的抗性级别。

评定标准如下：

级别	分级标准
高抗（HR）	蚜害指数低于抗性对照的 10%以上（不含 10%）
抗（R）	蚜害指数变动在抗性对照的 ±10%之间（含 10%）
中（M）	蚜害指数大于抗性对照的 10%而小于感性对照的 10%（不含 10%）
感（S）	蚜害指数变动在感性对照的 ±10%之间（含 10%）
高感（HS）	蚜害指数大于感性对照的 10%以上（不含 10%）

（六）复测

对第一次鉴定中苗蚜期两个抗性级别都达到抗或高抗的品种进行苗蚜期抗性的进一步鉴定；对于伏蚜抗或高抗的品种进行伏蚜期的进一步鉴定，鉴定方法设 3次重复，随机排列，其他同前述。

Ⅱ　棉花红铃虫抗性鉴定

我国棉花品种资源鉴定协作组拟定的抗红铃虫统一鉴定方法即在罩笼条件下接蛾、蛹以鉴定棉花对红铃虫的抗性。其方案如下。

（一）鉴定方法

采用罩笼接虫法，通过青铃取样调查，以单铃活虫数依照现行防治指标评定其抗性程度。

（二）田间设计

供试材料在罩笼内单行种植，每行 25株，行距 80 cm，株距 26 cm，不设重复。

（三）供试虫源及接虫量

收集当年虫害花中幼虫，在室内化蛹，羽化后，置于交配罐内，每罐内放入成虫 5～10对（♀♂各半），以 10%蜂蜜水为其补充营养。接虫前让其自由交配 3 d。于自然条件下的二代红铃虫发蛾始期，在罩笼内接虫，接虫密度 50对 /100 m^2。

（四）调查方法

进行再次抽样考查，第一次于接虫后 20～25 d内在各品种上取铃龄相近的青铃 50个（每株 2桃），第二次在品种上取铃龄相近的笑口棉桃 50个（每株 2桃），检查并计算各供试品种的单铃幼虫活虫数。

（五）分级标准

棉花的抗红铃虫性采用 5级分级。因鉴定方法、抗性指标不同，分级标准尚不一致。棉花品种资源鉴定协作组以单（青）铃活虫数为指标的分级标准为：

抗虫级别	二代红铃虫（头 /铃）	三代红铃虫（头 /铃）
高抗（HR）	≤ 0.1	≤ 0.3
抗（R）	＞0.1≤ 0.3	＞0.3≤ 0.5
中抗（MR）	＞0.3≤ 0.5	＞0.5≤ 0.7
感（S）	＞0.5≤ 0.7	＞0.7≤ 0.9
高感（HS）	＞0.7	＞0.9

（六）抗性评定

华中农业大学以种子子害率进行棉花抗性分级的标准是：将鉴定品系的子害率与对照品系的子害率进行比较，其计算公式为：

$$\text{鉴定品种（系）子害率比 CK}\pm\% = \frac{\text{鉴定品种（系）子害率} - \text{对照子害率}}{\text{对照子害率}} \times 100\%$$

抗性分级指标如下：

抗虫级别	鉴定材料子害率比对照
高抗（HR）	减少 41%以上
抗（R）	减少 20.1%～40.9%
中抗（MR）	减少 0.1%～20.0%
感（S）	提高 0.0%～20.0%
高感（HS）	提高 20.1%以上

吴正彬（1994）对上述两种分级标准进行研究后指出，以单铃活虫数为鉴定指标对不同材料的抗性进行评价，田间鉴定与罩笼鉴定结果不一致，不同地点田间鉴定结果亦不一致。而以子害率作为鉴定标准，不同实验结果吻合度好，结果较准确、可靠。现国内外的抗红铃虫育种中基本采用子害率作为抗性指标。

室内生物学测定需较完善的设备，成本高，一般在抗虫育种中应用较少，此处不加介绍。

三、作业思考题

1. 植物抗虫性鉴定的基本方法有哪些？
2. 棉花蚜虫及棉花红铃虫抗性鉴定过程中，分别应注意哪些问题？
3. 根据上述棉花蚜虫及棉花红铃虫抗性鉴定的方法以及当地的虫害情况，请设计一种植物害虫的抗性鉴定方案。

（陈学森）

实验 36　植物真菌病害抗性鉴定

真菌病害是作物产量损失的主要原因之一，作物病害的 80%由病原真菌所引起。迄今，对作物真菌病害的控制，一是选育并采用抗性品种，二是使用化学杀菌剂，三是采取预防措施，如轮作、避免受侵染土壤和带病原植物材料的传播等。然而，化学杀菌剂成本较高，且最终导致病原菌的抗药性，其残毒还引起环境污染等问题。综合采用有性杂交及现代生物技术选育并推广抗病品种，这是所有病害防治策略中最经济有效的方法。特别是重组 DNA 技术的创立和发展，已可将动物、植物、微生物的基因相互转移，突破了物种之间难以杂交的天然屏障，开辟了植物育种的新途径。近年来，一些科学家致力于利用基因工程方法，如基因转移技术，培育抗真菌病害的作物品种。该领域的研究，有的已取得显著的成果，有的出现很好的苗头，具有诱人的应用前景。

本实验重点学习小麦条锈病接种和鉴定的方法。小麦条锈病的接种方法很多，有涂抹法、喷粉法、喷雾法及注射法等。又因接种鉴定的时期不同，分为幼苗鉴定和成株鉴定。

一、试材及用具

1. 试材

小麦盆栽幼苗及菌种。

2. 用具

接种针、毛玻璃、小喷雾器、喷粉器、滴瓶、保湿桶、铅笔、指形管、酒精、塑料薄膜（或玻璃）、滑石粉及注射器等。

二、内容说明

抗病性鉴定（evaluation of disease resistance）是抗病育种的重要基础，从抗原筛选、后代选择、直到品种推广的全过程都离不开抗病性鉴定。狭义的抗病性鉴定是评价寄主品种、品系或种质对特定病害抵抗或感染程度，广义的抗病性鉴定还应包括病原物的致病性评价。鉴定方法包括自然鉴定、接种鉴定、田间成株鉴定、室内苗期鉴定、离体鉴定及间接鉴定等，在实际工作中则需根据植物、病害种类，目的要求和设备条件而定。下面分别介绍如下：

1. 田间自然鉴定

自然发病条件下的田间鉴定是鉴定抗病性的最基本方法，尤其是在各种病害的常发区，进行多年、多点的联合鉴定是一种有效方法。它能对育种材料或品种的抗性进行最全面、严格的考验。田间鉴定的方法因植物种类而异，大田作物的田间鉴定一般要进行人工接种，接种方法又因病菌而异。对棉花黄萎病等土传病害，除在重病地设立自然病圃外，在非病地设立人工病圃时，必须将事先培养的菌种，在播种或施肥时一起施入，以诱发病害。对于小麦锈病、玉米大斑病及稻瘟病等气传病害，可分别用涂抹、喷雾，及注射等方法进行接种，以使具有抗接触、抗侵入等抗病机制的品种也得以发病。

病圃的设置与利用是进行抗病性鉴定的基本条件，没有重而均匀的发病条件就难以对植物品种资源的抗病性作出可靠的鉴定。按照病圃发生病害种类的不同，病圃可分为单一病圃和多种病害混生病圃。单一病圃的优点是可以避免多种病害的干扰，有利于鉴定不同品种资源对不同病害的抗病性，同时也是选育单抗品种的必要条件；而多种病害混生病圃的优点是可在较短的时间内选育或鉴定出具兼抗或多抗性的材料。

对树体大，多年生的果树及观赏植物进行田间鉴定，可将待鉴定的材料按一定的株行距定植于大田，全年不使用任何杀菌药，并于发病盛期，每份材料调查 100～300 个果实或叶片的发病程度，计算病情指数。它的优点是能较全面准确地反应被鉴定材料的抗病性，结果可靠性较强，操作方便。缺点是占用较多的土地，费用较高。贺普超等（1995）、H. Kemp 等（1999）及 V. Ognjanov 等（1999）分别采用上述方法对葡萄及苹果的抗病性进行了研究。

2. 温室或田间接种鉴定

这种方法是将病原菌孢子或病毒直接接种到温室或田间植株的叶片、果实或根上，它适合对所有植物进行抗病性鉴定。由于抗病现象是寄主、病原物及环境条件三者共同作用的结果，因此，这种鉴定结果也能真实地反映被鉴定材料的抗病性，可靠性强。

接种鉴定的技术规程包括育苗、接种体的制备（病菌的分离、保存与孢子诱发）及接种 3 个环节，接种的方法有点滴法、喷雾法、浸根法、摩擦法及注射法等，叶片及果实接种，适宜选用点滴

法或喷雾法，而对于土传病害，如黄瓜枯萎病可采用孢子悬浮液浸根法进行接种。接种材料的发育程度及接种孢子浓度（选择压）等因素都会影响鉴定的效果，因此这些因素要通过试验，以便确定最佳方案。

3. 离体接种鉴定

从植物植株上取下子叶、叶片或果实进行离体接种鉴定，可鉴定那些以组织、细胞或分子水平的抗病机制为主的病害，如马铃薯晚疫病、小麦白粉病及烟草黑胫病等。离体鉴定具有操作简便，鉴定结果可靠等优点，可同时分别鉴定同一材料对不同病原菌的抗性，而不影响幼苗正常生长发育和开花结实。

鉴定方法不仅因植物、病菌种类而异，而且抗病性分级标准也因作物、病原菌的种类不同而存在很大的差别，例如白菜霜霉病的病情分级标准是：

级别	分级标准
0	无病
1	接种叶片上有稀疏的褐色斑点，不扩展
3	叶片上有较多的病斑，多数凹陷，无霉层
5	叶片病斑向四处扩展，叶背生少量的霉层
7	病斑扩展面积达 1/2～2/3，有较多的霉层
9	病斑扩展达 2/3以上，有大量霉层

而葡萄白粉病（田间自然鉴定）的病情分级标准是：

级别	分级标准
0	全果穗无病粒
1	果穗上感病果粒在 10%以下
3	果穗上感病果粒在 10% ～25%
5	果穗上感病果粒在 25% ～50%
7	果穗上感病果粒在 50% ～75%
9	果穗上感病果粒在 75%以上

$$\text{病情指数} = \frac{[\text{病级株（叶、果等）数} \times \text{该级代表数值}]}{\text{调查总株（叶、果等）数} \times \text{发病最高一级代表数值}} \times 100$$

病情指数反应了病害的普遍率和严重程度，指数越大，说明病情越严重，寄主的抗病性越差；指数越小，说明病情越轻，寄主的抗病性越强。

根据病情指数，可将植物对一些病害的抗病性进行分类，其中白菜霜霉病等病害适用下列标准：

抗病级别	分级标准
免疫（I）	病情指数 0
高抗（HR）	病情指数 0.01～15.00
抗病（R）	病情指数 15.00～35.00
中抗（MR）	病情指数 35.00～55.00
感病（S）	病情指数 55.00～75.00
高感（HS）	病情指数 75.00～100.00

小麦锈病流行地区广,产量损失大,一般减产 25% ～75%,在某些地区,小麦锈病甚至是限制小麦生产的主要因素。选育和栽培抗锈品种是防治小麦锈病危害的最根本有效措施。因此,在小麦育种过程中,必须了解和掌握抗锈性鉴定的方法。

小麦锈病有条锈、叶锈和秆锈 3种,由于地区间生态条件的差异,锈病发生的种类不同,而且危害的程度也各异。我国北方冬小麦区以条锈病为主,叶锈病、秆锈病次之;春麦区则以秆锈病为主。锈病的发生受到小麦材料的抗病能力、病原物的致病力和发病环境的影响,因此锈病在自然条件下,并非每年每地均严重发生。在进行抗病育种中,除在发病的麦田进行直接鉴定外,有时还必须在人工接种环境下,进行诱发鉴定。

三、方法步骤

(一) 锈病病菌接种

1. 幼苗接种

一般在温室内进行,于麦苗第一片叶子长达 4～5 cm时接种,等充分发病后再进行鉴定,这种方法的好处是可在较短的时间内测定大量材料对锈病的抗病性,便于鉴定不同小麦品种对不同锈病生理小种的抗病性,能防止当地未发现而外地已存在的新的生理小种向外传播。幼苗鉴定的接种方法有以下几种:

⑴ 涂抹法

此法主要在繁殖少量菌种或接种少量鉴定材料时应用。在接种鉴定前 10 d左右,将待鉴定的小麦品种的种子,播种于直径为 8～10 cm左右的小花盆内。每盆播种 2～3个品种,其中一个品种为易感病的诱发品种,以用作对照。各品种要相互隔开,插上木签,注明品种名称及播种日期等。在开始接种前,先从用以繁殖锈病孢子的麦苗上,采集病菌孢子放置于小指形管中 (注明菌种生理小种号及采集日期),然后从指形管中取出少许锈菌孢子放在洁净的毛玻璃上,用滴管加入少量水,用接种针将锈菌孢子与水拌匀备用。另外用洁净的手指蘸清水或 0.1%吐温(tween)水溶液将麦苗的叶片摩擦数次,去掉叶片表面的蜡质和茸毛,以利于菌液吸附于叶面上。用消毒过的接种针蘸上调制好的孢子液,涂抹于麦叶表面进行接种。一般将条、叶锈的孢子接种于叶片的正面,而秆锈菌则接种于叶片背面为好。然后记录并在木签上注明接种日期及所用菌种。接种后把麦苗随即放入保湿桶中 (即用一铁皮桶,其内盛水,保持 99% ～100%湿度),再用喷雾器喷降水雾,令麦苗和保湿桶的内壁黏满雾滴。喷雾不能过量,以防冲掉已接种的锈病孢子。喷雾后,马上盖严塑料薄膜或玻璃,把保湿桶放置在适宜的温度条件下。经 24 h左右,再将麦苗取出,移至阳光充分的温室内,约经两周后麦苗即可发病,此时即可鉴定品种的抗病力。

麦苗接种后,保湿阶段要求的最适温度,条锈为 9～13 ℃,叶锈为 15～20 ℃,秆锈为 18～22 ℃。自保湿桶中取出放入温室后平均温度最好分别控制在 16～18 ℃ (条锈),18～22 ℃ (叶锈),21～24 ℃ (秆锈)。光照时间每天应不少于 12 h,冬季光照不足,需每天增加一定时间的人工辅助光照。上述的温度和光照掌握的好坏是发病充分与否的关键。

在分别接种不同生理小种进行鉴定时,接种用的一切用具都要先行消毒,防止可能发生的污染影响鉴定结果。

⑵ 喷粉法

小喷粉器经消毒、干燥后,加入适量的干燥滑石粉,再加入少量新采集的锈病孢子,混合均匀

待用（滑石粉与孢子的比例约为 20∶1～30∶1）。接种用的锈病孢子应事先去除混在其中的杂质，以防喷粉时造成喷粉器堵塞。开始接种前，先将已去除叶片蜡质的盆栽麦苗，放入保湿桶内，用喷雾器在麦苗上均匀喷上雾滴，随即用喷粉器将上述稀释的孢子粉均匀地喷洒到每盆麦苗的叶片上，再用喷雾器喷雾，使麦苗和保湿桶内壁都黏上水滴，掌握水滴不下滴为度。最后盖上塑料薄膜，保湿阶段和以后各项操作及注意事项同前述。

⑶ 喷雾法

用小型喷雾器将制备好的新鲜孢子悬浮液（在喷雾器内，加入要接种的锈菌孢子，先用少量清水湿润后，搅成糊状，再加入足量的水至淡橘黄色即可）喷在叶片已去蜡质的麦苗上，接种后将麦苗放于保湿桶内保湿，以后的操作及注意事项同前述。

喷粉法及喷雾法适于对大量材料的接种鉴定。

2. 成株接种

成株接种多在田间进行，其方法是在待鉴定抗病力的品种或育种材料的四周播种高度感染锈病的品种作为锈病鉴定的诱发行。为了造成发病的环境，以得到可靠的鉴定结果，常需要在诱发行上每隔一定距离的麦苗上进行人工接种，以造成锈病的发病中心。用于接种的锈病孢子应是当地流行的优势小种，可以是一个小种，也可以是几个优势小种孢子混合。接种的方法如下：

⑴ 喷粉法

接种前，用手蘸清水将叶片拂擦数下，以去掉叶片蜡质，然后用喷雾器喷上雾滴，用喷粉器将由滑石粉稀释好的孢子粉喷于麦苗上，再用喷雾器喷上水雾，随即用小花盆或塑料薄膜覆盖保湿，历时 24 h揭开。此法多用于麦苗起身前后。

⑵ 注射法

此法多用于麦苗有一定生长高度的拔节期。接种前，应配制好孢子悬浮液，配制方法同前，于显微镜 400×视野中平均有 10～20个锈菌孢子数为适宜浓度。一般在诱发行上每隔 1 m左右选取 3～5个单茎分别注射接种。其方法是用注射器将孢子悬浮液从小麦心叶与其下的展开叶叶鞘相接处以下约 1 cm处注射，针头宜向下倾斜刺入，但不要刺穿，挤压少量悬浮液，以见到心叶处冒出水珠为度。孢子一般悬浮于液面，所以孢子悬浮液必须随用随搅拌或振荡。田间接种注射最好在阴天的傍晚进行。如天气干旱，接种后在接种点上浇水 1～2次，也可以在接种前或接种后适当灌水，以提高田间湿度，利于锈菌孢子萌发、侵染和发病。

除上述两种方法以外，还可以用喷雾法，即将配成的孢子悬浮液喷在诱发行上进行接种。接种后为了有利于锈病孢子萌发、侵染，也要进行保湿。

接种后，约两周后即可发病。但成株的抗病性鉴定一般在小麦乳熟期以后，锈病发展到高峰时进行，每个品种逐个进行调查记载。

（二）抗锈性鉴定

1. 幼苗鉴定

衡量小麦品种对锈病的抗病和发病程度，常用到反应型（感染型）、严重度和普遍率 3个指标。幼苗期鉴定一般考察其反应型。反应型是指植株受病菌侵染后的保卫性反应，可以用过敏性坏死的有无强弱，孢子堆能否形成，孢子堆的大小、多少等来判断。小麦品种对条锈菌的反应型可分为 6级，分级标准如表 5－1所示。

表 5－1　小麦锈病抗性分级标准

级别	抗性程度	品种病情反应
0	免疫型	叶片全绿，无病害症状
1	近免疫型	叶片上有点滴枯死斑和失绿反应，但无孢子堆
3	高度抵抗型	叶片孢子堆很小且很少，孢子堆周围有褪绿枯死斑
5	中度抵抗型	叶片上孢子堆小或中等，较分散，周围组织有枯死和失绿反应
7	中度感染型	叶片上孢子堆中等大小至很大，数量较多，周围组织无枯死反应，但有失绿现象
9	高度感染型	叶片普遍出现大孢子堆，孢子堆甚至联合形成宽而粗的条纹，叶片既无枯死反应也无失绿现象

2. 成株鉴定

⑴ 反应型

同幼苗鉴定。

⑵ 严重度

即病叶上着生孢子堆部分占整个叶片面积的百分率，用于表示病害发生的严重程度。从理论上讲，应将小区内的每一叶片都进行统计而后取平均值。但在实际工作中，往往因人力不足，而仅采用目测估计法，总体上目测评定叶片的发病情况，估计出发病的严重程度（严重率）。目前严重率分级标准尚不统一，但多数采用以下 7级分级标准：

级别　　孢子堆占叶面积的百分率（严重率）

0　　无孢子堆

1　　孢子堆占叶面积 ＜5%

2　　孢子堆占叶面积 5% ～10%

3　　孢子堆占叶面积 11% ～25%

4　　孢子堆占叶面积 26% ～40%

5　　孢子堆占叶面积 41% ～65%

6　　孢子堆占叶面积 ＞65%

然后计算严重度，计算公式如下：

$$\text{严重度} = \frac{(\text{各病级叶片数} \times \text{各相应病级严重率})}{\text{调查病叶叶片总数}} \times 100$$

⑶ 普遍率

指病害发生的普遍程度，即发病叶片数占调查总叶片数的百分率。

普遍率 =发病叶片数 调查叶片总数 ×100%

在实际工作中，一般也采用目测估计法进行观测。要求较精确鉴定时，可根据被鉴定材料小区面积的大小，随机选取 30～60叶进行观察记载。

四、作业思考题

1. 植物真菌病害抗性鉴定的基本方法有哪几种？

2. 配制条锈病孢子悬浮液，并用各种方法接种。试比较不同接种方法的鉴定效果。

3. 小麦条锈病发病的有利条件有哪些？在抗病性鉴定时应如何保证这些条件？锈菌接种时容易出现哪些问题干扰实验结果？

（陈学森）

实验 37　植物细菌病害抗性鉴定

植物病原细菌是引起植物病害的主要病原生物之一，虽然不及真菌病害种类多和危害大，但有些细菌病害是生产上的重要问题，如水稻白叶枯病，多种作物的青枯病、根癌病（冠瘿病），大白菜软腐病及猕猴桃溃疡病等。用化学方法防治细菌病害大多效果不很理想，而且污染环境。因此，抗病品种的选育及利用就成为防治细菌病害的重点。通过传统育种也能选育抗病品种，但不能利用亲缘关系较远的抗性资源，而且利用野生抗源很难获得抗病优质高产的作物品种（因抗性常常和不良农艺性状相连锁）。近年来，由于植物转基因技术的不断改进以及对植物和病原物相互作用的深入了解，使利用基因工程技术选育抗病品种成为一条有效的途径。

抗病性鉴定是抗病育种的重要基础。本实验重点学习目前普遍采用的几种植物细菌病害抗性鉴定的方法及其步骤。

Ⅰ　大田病圃法

利用自然病原，对田间发病情况进行调查，根据病情指数等确定植物品种对特定细菌病害的抵抗能力（抗病性）。例如，孙升（1999）对辽宁果树所国家李杏种质资源圃保存的 400余个李品种对细菌性穿孔病抗性进行了调查，结果表明，品种间差异甚大，并发现了一些免疫或极低感病品种，为李栽培和抗病育种提供了种质。现将调查方法及分级标准介绍如下：

（一）枝条

每份种质资源调查 1～3年生的枝条 10个，测量枝条长度，调查病斑数，计算每米枝条平均病斑数，并划分感病级别（见表 5－2）。

（二）果实

每品种从树的不同部位随机调查 200～400个果，计算病果率，并对果实的感病性进行分级（见表 5－2）。

（三）叶片

从每个品种各株树的不同部位随机采叶 500～600片，于室内混匀后，分级记数调查 200～300片叶，记载标准如下：

级别	分级标准
1	叶片无病斑
3	每叶病斑 1～5个
5	每叶病斑 6～10个
7	每叶病斑 11～15个
9	每叶病斑 16个以上

根据上述分级计算病情指数，并根据病情指数，将品种的感病性分为 6级（见表 5－2）。

表 5－2　李细菌性穿孔病抗性分级标准

级别	枝条病斑数 /（块 /m）	病果率 /%	叶片病情指数
免疫 (0)	0	0	0
极低感 (1)	0.1～3.9	0.1～1.9	0.1～14.9
低感 (3)	4.0～7.9	2.0～3.9	15.0～24.9
中感 (5)	8.0～11.9	4.0～5.9	25.0～34.9
高感 (7)	12.0～15.9	6.0～7.9	35.0～44.9
极高感 (9)	≥ 16	≥ 8	≥ 45

黄琼等 (2000)同样采用大田病圃法，对 158份蚕豆品种 (系)对蚕豆细菌性茎疫病抗性进行了鉴定。其做法是，在云南省历年蚕豆茎疫病发生严重的宾川设置病圃，实行统一供种，按统一方案种植，并于蚕豆苗期及结荚期进行两次茎疫病调查，发病率按田间植株枯死率计算，分级标准如下：

级别	分级标准
免疫 (I)	发病率 0～1%
高抗 (HR)	1% ＜发病率≤ 5%
抗 (R)	5% ＜发病率≤ 10%
感 (S)	10% ＜发病率≤ 20%
高感 (HS)	发病率 ＞20%

II　大田或网室接种法

一、试材及用具

超净工作台、光照培养箱、高压灭菌锅、接种针、毛玻璃、小喷雾器、喷粉器、滴瓶、保湿桶、铅笔、指形管、酒精、塑料薄膜 (或玻璃)、滑石粉及注射器等。

二、方法步骤

将分离的菌株接种到大田、网室或温室的植物材料上，根据发病情况鉴定植物品种、品系或种质的抗病性。具体方法及步骤如下：

(一) 植物材料的准备

将待鉴定的植物品种或种质播种在大田、网室或温室内，以备接种。

(二) 菌株的分离与接种

从病叶分离菌株，冻干保存，接种前将供试菌株移植在 NA斜面上，并稀释到一定的浓度，接种用菌悬液浓度一般为 3×10^{8} cfu/mL。接种的时间与方法因植物、病害而异，例如，番茄细菌性斑点病可在四叶期喷雾接种，而水稻细菌性条斑病在孕穗期采用针刺接种法效果最佳。

(三) 病情记载及分级标准

接种后 7～15 d调查发病情况，记载病级。病情分级标准不仅因植物、病害而异，即使同一植物的同一病害，采用不同的接种方法，自然就有不同的发病状态，评价其病情的标准也就不同。

例如番茄细菌性斑点病抗性鉴定的分级标准是 (赵廷昌等，2000)：

级别	分级标准
1	无病斑
3	病斑 1～10个/株
5	病斑 11～20个/株
7	病斑 21～40个/株
9	病斑大于 40个/株

水稻细菌性条斑病针刺接种病情的分级标准是(许志刚等,1994):

级别	分级标准
0级 高抗(HR)	刺孔干枯,孔周围无病变组织
1级 抗(R)	刺孔边绿有病变组织,长度在 5 mm以内
3级 中抗(MR)	病斑长度在 6～10 mm之间,无菌脓泌出
5级 中感(MS)	病斑长度在 11～20 mm之间,有菌脓可见
7级 感(S)	病斑长度在 21～30 mm之间,菌脓多
9级 高感(HS)	病斑长度 >30 mm,菌脓很多

三、作业思考题

1. 大田病圃法与网室接种法有何区别?
2. 在利用接种法进行植物细菌病害抗性鉴定过程中,应注意哪些问题?

(陈学森)

实验 38 植物病毒病害抗性鉴定

植物病毒是导致粮、菜、果、花卉产量下降,品质变劣的重要原因之一。自 1892年俄国Iwanowsky发现烟草花叶病毒以来,已被正式命名的植物病毒 789种,并明确病毒只含有一种类型的核酸,即核糖核酸(RNA)或脱氧核糖核酸(DNA),20世纪 70年代后发现了只含有小相对分子质量 RNA,不含蛋白质,侵染活性很高的类病毒 25种,20世纪 80年代后发现了含有线状病毒基因组 RNA和与类病毒相似的环状 RNA的拟病毒 40种。

植物病毒种类多,繁殖速率快,传播途径广,并且缺少有效防治的药剂和措施。因此,植物病毒病一旦流行,危害之重,已超过真菌、细菌病害。因此,加强植物病毒研究,减轻植物病毒危害,对国民经济的发展具有重要意义。

本实验重点学习目前普遍采用的几种植物病毒病害检测及抗性鉴定的方法及步骤。

一、试材及用具

1. 试材

发病的植物组织及家兔等。

2. 用具

高速冰冻离心机及离心管等。

3. 试剂

相对分子质量为 6 000的聚乙二醇(PEG-6 000)及氯仿等。

二、方法步骤

（一）病毒检测

可用于植物病毒检测的方法主要有生物学测定、血清学检测、电镜检测、免疫电镜以及酶联免疫吸附反应（ELISA）、免疫 PCR等分子生物学方法，其中血清学检测是快速、准确、灵敏度高、成本低的病毒检测方法，可用于实际检测工作中去，本实验重点介绍，其他方法可查阅有关文献资料。

利用血清学技术进行病毒检测，主要依据血清学反应（免疫学反应），即抗原与抗体之间发生的各种作用。抗原指的是能诱导产生抗体的一类物质，它可以是病毒、细菌、真菌、植物菌原体等微生物，也可以是酶类、DNA、RNA、类脂、多糖等有机化合物，甚至还可以是叶片、枝条等各类组织。抗体是指由抗原注射到动物体内诱导产生的、并能与抗原在体外进行特异性反应的一类物质，主要是一些免疫球蛋白。含有抗体的血清通常称为抗血清。抗原能与由其诱导产生的抗体发生凝集、沉淀等反应，利用病原物中特异性强的抗原与相应的抗体反应，就能实现对病原物（病毒）的检测、鉴定。目前国际上已制备出 200余种重要植物病毒抗血清。我国农业部植检所为满足植物病毒检疫的研究需要，先后制备出 30余种植物病毒抗血清。利用血清学技术检测病毒，主要包括如下 3个环节。

1. 病毒抗原的分离与纯化

利用高速冰冻离心机等设备以及聚乙二醇（PEG）、氯仿等化学药品，从冰冻的病组织中分离、纯化病毒抗原。其操作步骤如图 5－1所示。

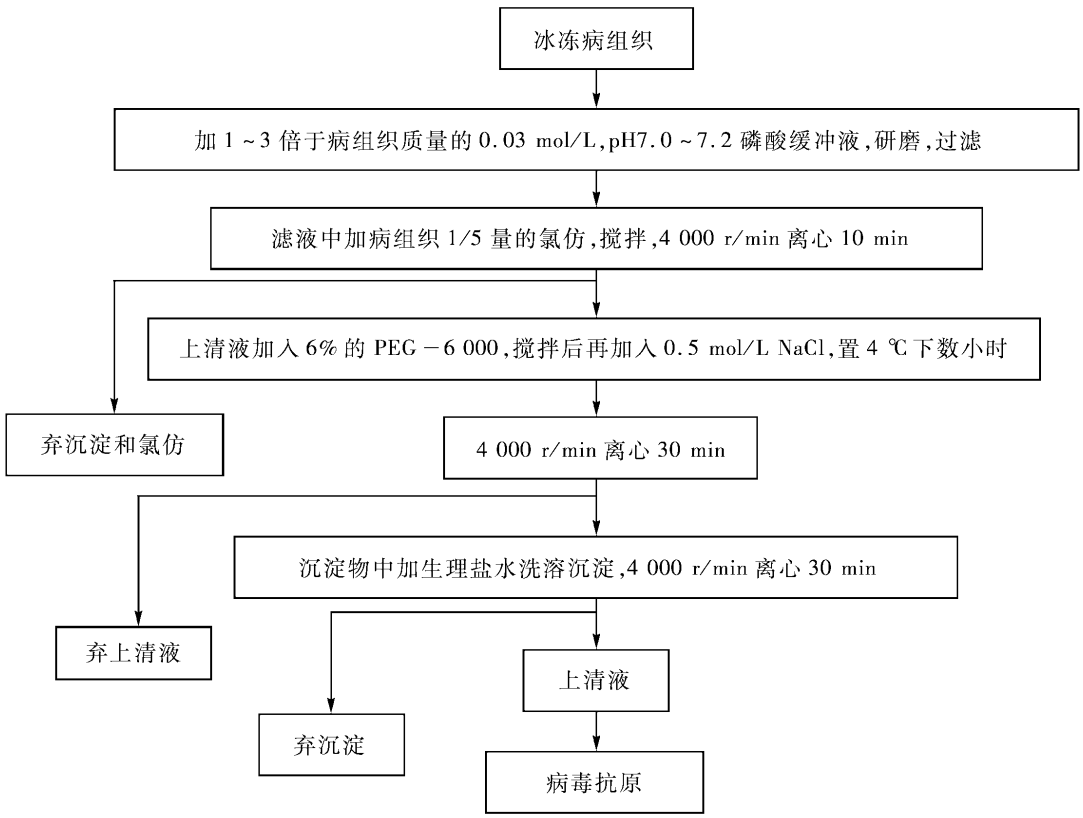


图 5－1　病毒抗原的分离与纯化

2. 病毒抗血清的制备

病毒抗血清的制备主要包括试验动物选择、抗原注射、血样采集以及抗血清的收集与保存等过程，可用图 5－2表示：

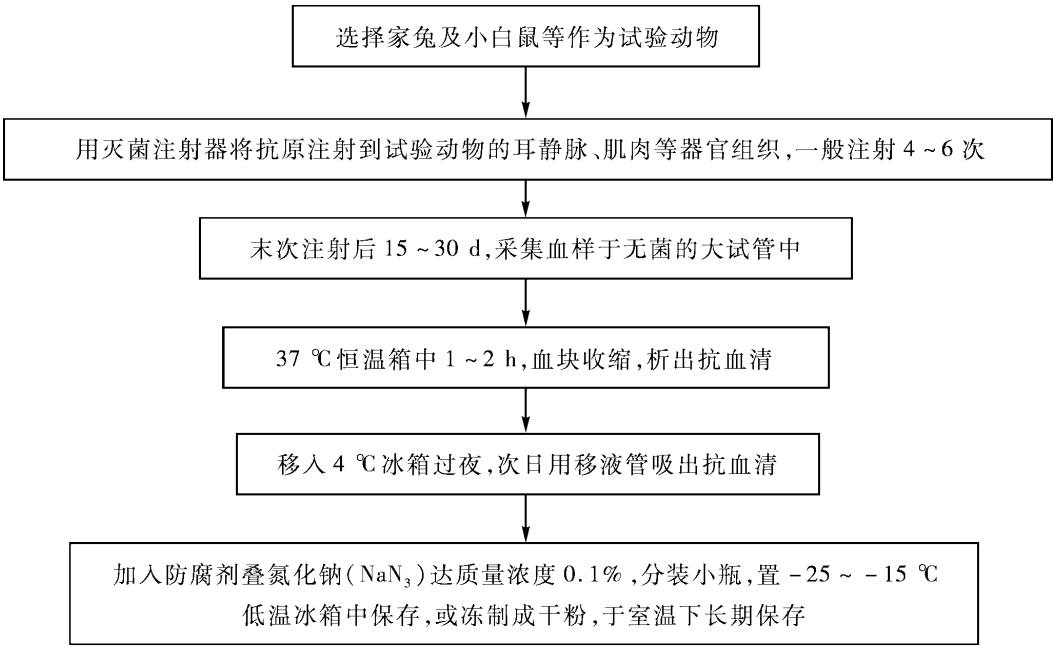


图 5－2　病毒抗血清的制备与保存

3. 血清学反应

将抗血清及抗原进行一系列稀释后，采用试管沉淀、小试管环状沉淀、玻片凝集、免疫双扩散、免疫电泳及荧光抗体等方法进行血清学反应，从而实现对病毒的检测与鉴定。

（二）病毒病抗性鉴定

病毒检测的对象是病原物（病毒），是对病毒定性（病毒的有无及其种类）与定量的分析鉴定，而抗性鉴定的对象是寄主，即植物品种或种质对特定病毒的抵抗能力。目前植物病毒病抗性鉴定所采用的方法，大都为大田病圃法。例如，刘琴等（2002）对 110个小麦引进品种在自然病圃区进行了对小麦黄花叶病的抗性鉴定。主要做法是，每个品种分别播种，设置对照与重复，于病害发生期调查发病率。所采用的病情分级标准是：

级别	分级标准
1　抗（R）	发病率 0～9.9%
2　中抗（MR）	发病率 10%～19.9%
3　中感（MS）	发病率 20%～39.9%
4　感（S）	发病率≥40%

三、作业思考题

1. 植物病毒检测有哪几种方法？各有何优缺点？
2. 何为抗原？抗体？抗血清？

3. 血清学技术检测植物病毒，主要包括哪几个步骤？

（陈学森）

实验 39　植物抗倒伏性鉴定

作物的倒伏对产量和品质、机械化收获等均有很大影响，在农业生产技术日益普及和农业生产水平不断提高的情况下，提高作物品种的抗倒伏性尤为重要。

引起倒伏的原因是多方面的，不适当的栽培方法（如施用氮肥过多，种植密度过大，不适宜灌溉）和不良的气候条件（如大风、大雨等）都容易引起倒伏，但这些都是影响倒伏的外因，而品种的抗倒伏性是决定倒伏的内因。所以，预防农作物倒伏，不仅要采用恰当的栽培方法，更为重要的是选育抗倒伏的品种。

作物的倒伏可分为茎倒伏和根倒伏。小麦主要是茎倒伏。鉴定倒伏的方法有直接鉴定和间接鉴定两类。

本实验学习并掌握小麦倒伏性鉴定的方法，并对几个品种进行抗倒伏性评定。

一、试材及用具

1. 试材

小麦育种试验地及几个小麦品种植株样本。

2. 用具

米尺、天平、剪刀及游标卡尺等。

二、方法步骤

（一）田间直接鉴定

1. 鉴定时间

灌浆至成熟期间是小麦常见的因遇风雨或肥水管理不当而发生倒伏的时期。一般在小麦发生倒伏的当天或第二天进行鉴定，5～10 d后再观察记载一次，以确定倒伏后恢复直立的能力。

2. 程度的鉴定

在田间鉴定时，用目测估计的方法，也可自制大的量角器进行测定，评定倒伏程度。以倒伏植株与直立植株所成角度，将倒伏程度分为 4级，即：

级别	分级标准
0	不倒伏
1	轻微倒伏，植株倾斜 15°以内
2	中等倒伏，植株倾斜 15°～45°
3	倒伏严重，植株倾斜 45°以上

在鉴定倒伏程度的同时，还要目测记载倒伏面积或倒伏面积占整个小区面积的百分数，对倒伏面积少但倒伏程度严重者，应调查其发生倒伏的原因是否是由于局部土地低洼或局部地区曾有旋风等特殊情况；否则，这种倒伏面积小而倒伏程度严重者，往往不比倒伏面积大而倒伏程度轻的优越。

（二）室内间接鉴定

1. 材料来源

将在田间进行过抗倒伏鉴定的材料取样，分别编号，带回室内作为鉴定材料。

2. 鉴定方法

⑴ 化学性质的鉴定

测定矿质、木质素、灰分、纤维素，及氮、磷、钾的含量等。

⑵ 植物组织性状的测定

观察维管束的多少及排列方式、茎壁厚度等 。

⑶ 形态性状的鉴定

测定植株高度、基部节间长度和直径等。

⑷ 机械性状的鉴定

测定抗折断力、基部茎秆单位长度质量等。

三、作业思考题

1. 你所鉴定的材料中，哪个材料抗倒伏？为什么？
2. 鉴定时所考虑的各类性状与抗倒伏性的关系如何？为什么？

（陈学森）

实验 40 植物抗寒性鉴定

我国植物种类繁多，分布区域广，在晚秋和早春时期发生的冻害和冷害两种低温危害，常常给越冬作物和果木造成严重伤害。冻害由 0 ℃以下低温造成，冷害由 0 ℃以上低温引起，冷害对植物的伤害程度，除取决于低温外，还取决于低温维持时间的长短。植物抗寒性的强弱决定其生长季节，因此，蔬菜作物利用抗寒品种，可以将露地栽培提前，提早供应市场；而选育抗寒性强的果树品种，不仅是寒带果树育种者的主攻方向，而且也是温带甚至热带果树育种者重要育种目标之一。

本实验重点学习实验室间接鉴定果树抗寒性的方法和步骤。

一、试材及用具

1. 试材

植物枝条或花朵，将采回的枝条剪成 40 cm 左右的长度，用自来水冲洗数遍（洗掉泥土、灰尘、虫卵），再用蒸馏水冲洗 3次，然后用吸水纸吸干水分，最后将枝条末端进行蜡封。将每个品种蜡封后的枝条分成相等的 6份，其中 1份作为对照，其余每份作为一个低温处理，放于冰箱中（0～4 ℃）保存备用。每次处理时，各取参试品种的 1份枝条放于超低温冰箱或程控冰箱内进行低温处理，处理温度梯度为：CK（0 ℃），－20 ℃，－25 ℃，－30 ℃，－35 ℃，－40 ℃。降温速度为 4 ℃ /h，达到目的处理温度后维持 12 h，然后逐步升温，升温速度亦为 4 ℃ /h。花朵的处理温度梯度为：CK（0 ℃），－1 ℃，－3 ℃，－5 ℃，－6 ℃，－7 ℃，－8 ℃。

2. 用具

烘箱、发芽箱、培养皿、标牌、电导仪、具塞刻度试管 (20 mL)、恒温水浴锅、温度计、玻璃棒、天平、研钵、石英砂、高速台式离心机、分光光度计、微量进样器、荧光灯 (4 000 lx)、容量瓶 (250 mL、25 mL)、聚丙烯酰胺凝胶垂直板电泳槽、刻度吸管 (10 mL、5 mL)及离心管、透光照相仪等。

二、内容说明

植物的抗寒性鉴定可分为田间鉴定和实验室间接鉴定两种方法。

1. 田间鉴定

田间自然鉴定就是在冻害发生期 (早春及晚秋)对受冻的田间植株一定器官、组织以一定的标准进行评价、比较,然后根据冻害情况评价抗寒性。

陈学森等 (2001)对山东省春季“倒春寒”发生后,受害的核果类果树的花器官的抗寒性进行了调查,选出了当地花期抗寒性较强的红荷包、红丰等杏品种,证明种间的抗寒力大小顺序是:桃 >杏 >李 >大樱桃。

赵玉田 (1993)对不同生态型玉米的抗寒性进行了田间鉴定,测定的项目包括 3个抗冷指标:

相对出苗率 (RER):

$$RER=\frac{\text{第一期出苗率}}{\text{第二期出苗率}}\times 100\%$$

出苗指数 (EI):

$$EI=\frac{\text{某日出苗数}\times\text{播后天数}}{\text{出苗总数 (30 d)}}$$

幼苗干物重 (SDW),取地上部三叶期 10株幼苗,烘至恒重。

3个抗冷特性以总指数值 (TIV)表示,即占各自等级顺序之和。其值反应了低温下种子出苗生长和干物质积累能力。

田间鉴定能最直接地反映不同品种在同一条件下的抗寒性差异。该法直接、简单,可进行大范围、大群体的评价,但受地域、品种数量的限制,只能比较少数几个同一地段的品种之间的抗寒力差异,不能对它们的抗寒能力进行量化。

2. 实验室间接鉴定

实验室间接鉴定,就是根据作物某些生理生化指标及物理指标间接推断供试材料的抗寒性。

(1) 物理指标

Lyons和 Raison (1970)证明低温发生时,植物生物膜首先发生膜脂的物相变化,膜的外形和厚度发生变化,膜上产生龟裂,因而膜的透性增大,电解质大量外渗。抗寒性强的品种细胞膜透性增大程度轻,抗寒性弱的品种与之相反。因此,测量电解质外渗量变化可以比较植物的抗寒性。在黑穗醋栗、梨、猕猴桃 (Shaoli Lu, 1990)等许多种果树的不同器官,如花、枝、叶等都有相似结论。另外,通过电导率值配以 Logistic方程,可以求出半致死温度,确定植物的临界致死温度。

鉴定抗寒性时常用差示温度分析来测量深过冷。以 DTA法测定,一般植物在零下几度即散热结冰,称为高温散热 (HTE)。经过低温锻炼的抗寒木本植物,在连续降温过程中,可见到有多次散热,第一次在零下几度,主要是细胞外结冰,最后一次散热可达 −45～−20 ℃的低温以下,

叫低温散热 (LTE)。在低温散热前一刹那的温度,即深过冷温度,用 LTE温度表示。深过冷低温散热时,可出现细胞内结冰而使组织死亡。日本京都大学 S. K. Kang (1998)等对苹果、桃、梨、柿子和葡萄 5种落叶果树通过温度分析测定了两种散热 HTE和 LTE,发现柿子与葡萄仅有 LTE,所有树种的低温散热温度与花芽的半致死温度一致。

(2) 生理生化指标

主要包括超氧化物歧化酶 (SOD)、过氧化氢酶 (CAT)、过氧化物酶 (POD)活性测定及同工酶分析、丙二醛 (MDA)及可溶性糖含量等方法。

三、方法步骤

(一) 质膜透性测定——电导法

近年来的研究表明,在低温伤害尤其冷害中,膜系统常常是最先受到伤害的部位,寒害能使脂膜受损伤,透性加大,细胞内离子 (主要是钾离子)外渗量增多,电导率加大。因此,可以用电导仪测定溶液的电导率,求算电解质渗出率 (或称伤害率)。伤害率愈高则愈不抗寒,反之则愈抗寒。

1. 电解质渗出率的测定

取处理和对照样品各 0.5 g放入试管中,加 10 mL去离子水,置 25 ℃下 10 h,用玻璃棒搅拌均匀,然后用电导仪测电导率值分别为 T_1 和 C_1。再将试管放入沸水中 10 min,待其冷却至 25 ℃时,测得处理和对照的电导率值为 T_2 和 C_2,按下式计算电解质渗出率和伤害度:

$$\text{电解质渗出率} = \frac{\text{浸泡液电导率值}}{\text{煮沸后电导率值}} \times 100\%$$

$$\text{伤害度} = \frac{\text{处理电导率值 } T_1 - \text{对照电导率值 } C_1}{\text{处理煮沸后电导率值 } T_2 - \text{对照煮沸后电导率值 } C_2} \times 100\%$$

2. 绝对电解质渗出量的测定

有时为了求得电解质的绝对渗出量,需要用分析纯的 KCl配成不同浓度的标准液 (0.01 ~ 10 mmol/L),在 25 ℃下测定其电导率值,并绘制电导率 (μS/cm) —质量浓度 (mg/mL)标准曲线。由标准曲线查知样品的外渗电导率值相当于 KCl的质量浓度,再折算每克材料的绝对外渗量 (mg/g),即

绝对电解质渗出量 (mg/g) = (A × B) /W

式中:A——根据样品电导率值,从标准曲线中查出的与 KCl相当质量浓度,mg/mL

B——浸泡液的体积,mL

W——样品鲜重,g

3. 注意事项

(1) 在电导测定中一般应用去离子水,若制备困难可用普通蒸馏水代替,但要在测定中设一空白试管,测定样品时要同时测定其空白电导值,按下式计算相对电导度:

$$\text{相对电导度} = \frac{S_1 - \text{空白电导值}}{S_2 - \text{空白电导值}}$$

(2) CO_2 在水中的溶解度较高,在测定电导时要防止高 CO_2 气源和口中呼出的 CO_2 进入试管,以免影响结果的稳定性。

(3) 温度对溶液电导影响很大,故 S_1 与 S_2 必须在相同温度下测定。

（二）超氧化物歧化酶（SOD）测定

超氧化物歧化酶（SOD）是一种清除超氧阴离子自由基的酶，普遍存在于植物体内。本实验依据超氧化物歧化酶抑制氮蓝四唑（NBT）在光下的还原作用来确定酶活性大小。在有可氧化物质存在时，核黄素可被光还原，被还原的核黄素在有氧条件下极易再氧化而产生超氧阴离子自由基，超氧阴离子自由基可将氮蓝四唑氧化为蓝色的甲臜，后者在 560 nm 处有最大吸收。而 SOD 可清除超氧阴离子自由基，从而抑制了甲臜的形成。于是，光还原反应后，反应液蓝色愈深说明酶活性愈低，反之，酶活性愈高。据此可以计算出酶活性大小。

1. 试剂配制

⑴ 0.05 mol/L磷酸缓冲液（pH7.8）。

⑵ 130 mmol/L甲硫氨酸（Met）溶液

称 1.939 9 g Met，用磷酸缓冲液定容至 100 mL。

⑶ 750 μmol/L氮蓝四唑（NBT）溶液

称取 0.061 33 g NBT，用磷酸缓冲液定容至 100 mL，避光保存。

⑷ 100 μmol/L EDTA－Na_2 溶液

称取 0.037 21 g EDTA－Na_2，用磷酸缓冲液定容至 1 000 mL。

⑸ 20 μmol/L核黄素溶液

称取 0.007 53 g核黄素，定容至 1 000 mL，避光保存。

2. 酶液提取

称取处理和对照样品各 0.5 g 加入 5 mL磷酸缓冲液，冰浴研磨提取，然后 15 000 r/min离心 10 min，所提上清液为酶液。

3. 显色反应

3 mL反应液为 0.05 mol/L磷酸缓冲液 1.5 mL，750 μmol/LNBT溶液、130 mmol/L甲硫氨酸（MET）溶液、100 μmol/L乙二胺四乙酸二钠（EDTA－Na_2）液、20 μmol/L核黄素各 0.3 mL，蒸馏水 0.25 mL和 0.05 mL酶提取液（对照管加蒸馏水）。混匀后将 1支对照管置暗处，其他各管于 4 000 lx日光灯下反应 20 min（要求各管受光情况一致，温度高时间缩短，温度低时间延长）。

4. SOD活性测定与计算

反应结束后，以不照光的对照管做空白，分别测定其他各管的光吸收，已知 SOD活性单位以抑制 NBT光化还原的 50%为一个酶活性单位来表示，按下式计算 SOD活性。

$$\text{SOD总活性} = \frac{(A_{CK} - A_E) \times V}{A_{CK} \times \frac{1}{2} \times m \times V_t}$$

$$\text{SOD比活力} = \frac{\text{SOD总活性}}{\text{蛋白质质量分数}}$$

式中：　OD总活性以每克样品鲜重的酶活性单位表示

比活力单位以酶单位 /mg蛋白表示

A_{CK}——照光对照管的光吸收值

A_E——样品管的光吸收值

V——样液总体积，cm^3

V_t——测定时样品用量，cm^3

m——样品质量，g

蛋白质质量分数单位为：mg蛋白 /g样品质量。

研究表明，当遭受低温胁迫时，SOD活性会下降，下降的百分率与品种抗冷性呈负相关，故能反应品种间抗冷能力的高低。

（三）过氧化氢酶（CAT）活性的测定

低温胁迫下，细胞内易产生 H_2O_2 破坏膜系统的稳定，而过氧化氢酶（CAT）能把 H_2O_2 分解为 H_2O 和 O_2，从而清除 H_2O_2，维护膜的稳定性。研究表明，抗寒性强的品种有较高的过氧化氢酶活性，且随温度下降，抗寒性强的品种的过氧化氢酶活性下降幅度小，与抗寒性呈显著性相关。

CAT酶活性大小可用一定时间内分解的 H_2O_2 量来表示。在反应系统中加入一定量（反应过量）的 H_2O_2 溶液，经酶促反应后，用标准高锰酸钾溶液（在酸性条件下）滴定多余的 H_2O_2，即可求出被 CAT分解的 H_2O_2 量：

$$5H_2O_2 + 2KMnO_4 + 4H_2SO_4 \qquad 5O_2 + 2KHSO_4 + 8H_2O + 2MnSO_4$$

1. 试剂配制

（1）10% H_2SO_4。

（2）0.2 mol/L 磷酸缓冲液（pH 7.8）。

（3）0.1 mol/L 高锰酸钾标准液

称取 $KMnO_4$（AR）15.8 g 用新煮沸冷却蒸馏水配制成 1 000 mL，用 0.1 mol/L 草酸标定。

（4）0.1 mol/L H_2O_2

取 30% H_2O_2 溶液 5.68 mL，稀释至 1 000 mL，用标准 0.1 mol/L $KMnO_4$ 溶液在酸性条件下标定。

2. 酶液提取

取剪碎的样品 2.5 g加入磷酸缓冲液（pH7.8）少量，研磨成匀浆，转移到 25 mL容量瓶中，将研钵冲洗干净，冲洗液转至容量瓶中，并用同一缓冲液定容，4 000 r/min离心 10 min，上清液为酶粗提液。

3. 酶液滴定

取 50 mL三角瓶 4个（两个测定，两个对照），测定加入酶液 2 mL，对照为煮死酶液2.5 mL；再加入 2.5 mL 0.1 mol/L H_2O_2，同时计算时间，于 30 ℃恒温水浴中反应 10 min，立即加入 10% H_2SO_4 2.5 mL。然后用 0.1 mol/L $KMnO_4$ 滴定，至出现粉红色（30 min内不消失）为终点。

4. 结果计算

酶活性用每克鲜重样品在 10 min内分解 H_2O_2 的质量（mg）表示。

$$\text{酶活性}\ (\text{mg}H_2O_2/\text{g FW}) = \frac{(A-B)\times\frac{V}{a}\times 1.7}{m}$$

式中：A——对照 $KMnO_4$ 滴定体积，mL

B——酶反应后 $KMnO_4$ 滴定体积，mL

V——酶提取液总量，mL

a——反应所用酶液量，mL

m——样品质量，g

1.7——1 mL 0.1 mol/L $KMnO_4$ 相当于 1.7 mg H_2O_2

5. 注意事项

所用 $KMnO_4$ 溶液及 H_2O_2 溶液使用前要经过标定，0.1 mol/L H_2O_2 要新配制。

（四）过氧化物酶（POD）活性测定及同工酶分析

1. 过氧化物酶（POD）活性测定

在过氧化物酶催化下，过氧化氢分解成水和活性氧，活性氧能氧化联苯胺产生一种蓝色的化学物质，该蓝色化合物在波长 580 nm处有一最大吸收峰。蓝色物质的生成速率（dx/dt）与反应系统中过氧化氢分解速率呈正相关。因此，用分光光度计测出蓝色物质光密度的变化（单位时间内反应液中光密度的变化），可以表示过氧化物酶的活性。

⑴ 试剂配制

① 0.1 mol/L pH8.5 Tris—HCl缓冲液

称取 1.211 g Tris—HCl溶于 80 mL蒸馏水中，加 36.5% HCl 0.42 mL，用 NaOH 调 pH 至 8.5，定容至 100 mL。

② 0.1 mol/L过氧化氢

1 mL 30%的过氧化氢稀释到 100 mL。

③ 0.005 mol/L联苯胺醋酸 —醋酸钠缓冲液

在 200 mL容量瓶中，先加入 2/3的蒸馏水及 2.3 mL冰乙酸和 184 mg联苯胺。在 50～60 ℃水浴中加热溶解，然后加入 5.45 g无水醋酸钠。待完全溶解后，冷却，加水定容至刻度线。

⑵ 酶液提取

将样品剪碎，称取 1 g加入酶提取液（0.1 mol/L pH8.5Tris—HCl缓冲液）5 mL和少量石英砂，在研钵中磨碎。然后再次加入 5 mL酶提取液稀释。转入离心管在 1 500 r/min的速度下离心 15 min。取上清液贮于冰箱中待用。

⑶ 酶活性测定

测定前，将酶液稀释 300～500倍。吸 1 mL酶液，加入 2 mL联苯胺醋酸 —醋酸钠缓冲剂，在 28～32 ℃水浴中保温 3～5 min。测定时，加入 1 mL 0.1 mol/L过氧化氢，立即摇匀，并转入比色皿中，用分光光度计在波长 580 nm下测定光密度的变化。从加入过氧化氢起计时，每 15 s读数一次。

⑷ 酶活性的计算

过氧化氢与酶液接触后，立即产生蓝色物质，分光光度计上光密度读数不断上升，但随反应时间延长，光密度变化速率减小。在开始反应的 45～60 s之内，光密度呈直线上升。取第 15～45 s之间的光密度变化，按下式计算样品中过氧化物酶活性：

$$E=\frac{\Delta OD15\sim45\times2\times\text{总稀释倍数}}{1\,000}$$

式中：E——酶活性，$\triangle OD\cdot mg^{-1}\ FW\cdot min^{-1}$

研究表明，抗寒性强的品种 POD活性高于抗寒性弱的品种，且随温度下降变化幅度较缓。

2. 过氧化物酶（POD）同工酶分析

用聚丙烯酰胺凝胶垂直板电泳技术分离 POD同工酶。

⑴ 贮液的配制

① 30% Acr—0.8% Bis贮液

称取 30 g Acr和 0.8 g Bis,用 50 mL重蒸水加热溶解,将溶液用定性滤纸过滤到 100 mL容量瓶内,定容后盛于棕色瓶中,于 0～4 ℃冰箱中保存。

② 1 mol/L Tris—HCl缓冲液 (pH8.8)

称取 121.14 g Tris用重蒸水溶解后倒入 1 000 mL容量瓶中,用浓盐酸调 pH至 8.8,最终加水定容至 1 000 mL,然后用滤纸过滤,盛于棕色瓶中,放入 0～4 ℃冰箱中保存。

③ 1mol/L Tris—HCl缓冲液 (pH6.8)

称 12.114 g Tris用重蒸水溶解后倒入 100 mL容量瓶中,用浓盐酸调 pH至 6.8,最终加水定容至 100 mL,然后用滤纸过滤,盛于棕色瓶中,放入 0～4 ℃冰箱中保存。

④ 电极缓冲液

称取 141.1 g甘氨酸和 30 g Tris用重蒸水加热溶解后倒入 1 000 mL容量瓶中,加水定容至 1 000 mL。用时稀释 20倍,调 pH至 8.3。

⑤ 1%过硫酸铵溶液

称 0.5 g过硫酸铵溶于 50 mL重蒸水中,放入 0～4 ℃冰箱中,可保存一周。

⑥ 溴酚蓝溶液

称 0.2 g溴酚蓝溶于 100 mL重蒸水中,配成 0.2%溶液。

⑵ 凝胶板的制备

① 分离胶的制备

分离胶质量浓度多为 7%,按照表 5－3进行配制。先用刻度吸管准确地吸取 30% Acr—0.8% Bis和 1 mol/L Tris—HCl(pH8.8)于抽滤瓶中,用电动吸引器抽气减压,除去溶液中气泡,抽气毕,再加入 1%过硫酸铵溶液和 TEMED,摇匀后,小心地将凝胶加入凝胶板模具内,上面加一水层,在 25～30 ℃的温度下进行聚胶,约 1 h。

表 5－3 分离胶的配制

贮 液	不同配量及凝胶质量浓度所需贮液 /mL					
	20 mL			30 mL		
	5%	7%	10%	5%	7%	10%
30% Acr—0.8% Bis	3.2	4.5	6.5	4.9	6.8	9.7
1 mol/L Tris—HCl pH8.8	16.3	15.0	13.0	24.3	22.4	19.5
1%过硫酸铵	0.5	0.5	0.5	0.8	0.8	0.8
TEMED (为 μL)	20	20	20	40	40	40

TEMED (四甲基乙二胺)也可用 DMPN (二甲氨基丙腈)或 TEOA (三乙醇胺)替代。

② 隔层胶的配制

按表 5－4进行隔层胶的配制,用刻度吸管准确吸取 30% Acr—0.8% Bis和 1 mol/L Tris—HCl(pH6.8)于抽滤瓶中,用电动吸引器抽气减压,与此同时,吸去分离胶上层的水层,抽气毕,加入 1%过硫酸铵溶液和 TEMED,立即灌注隔层胶 (凝胶板需要迅速加入篦子),其中加一水层,约 1 h可聚合好。

表 5－4　隔层胶的配制

贮　液	不同配量及凝胶浓度所需贮液 /mL			
	10 mL		20 mL	
	3%	4%	3%	4%
30% Acr－0.8% Bis	1.0	1.3	2.0	2.6
1 mol/L Tris－HCl pH6.8	1.0	1.3	2.0	2.6
重蒸水	7.7	7.1	15.4	14.2
1%过硫酸铵	0.3	0.3	0.6	0.6
TEMED (为 μL)	15	15	30	30

TEMED (四甲基乙二胺)也可用 DMPN (二甲氨基丙腈)或 TEOA (三乙醇胺)替代。

(3) 加样

装置好垂直板电泳槽,用 1%热琼脂封好缝隙。

每克鲜样加 3.0 mL 0.1 mol/L的磷酸缓冲液 (pH7.0),研磨,用纱布粗过滤,滤液离心:4 000 r/min, (0±2) ℃,取上清液作供试酶液。

用 10 V/cm预电泳 3 min后,用微量进样器吸取样品液,每管分别加入 50 μL。

(4) 电泳

加样毕,注电极缓冲液入上、下电泳槽,在上槽中加入一滴溴酚蓝。接通电源,上槽为负极,下槽为正极。调节电流为 2 mA/cm (2 mA/管),在冰箱内进行。待溴酚蓝迁移至下端约 0.5～1 cm处停止电泳,约 2 h。

(5) 染色

将脱下的凝胶,用去离子水冲洗凝胶板后,放入长方形白瓷盘中染色。

① 染色贮液配制

A. 0.2 mol/L醋酸钠溶液

称 2.8 g醋酸钠溶于 100 mL重蒸水中。

B. 5 mmol/L硫酸锰溶液

称取 0.168 g硫酸锰,溶于 200 mL重蒸水中。

C. 联苯胺溶液

称 0.5 g联苯胺,溶于 10%冰醋酸 250 mL中。

D. 愈创木酚溶液

称 1.35 g愈创木酚,溶于 250 mL 10%醋酸中。

以上 4种溶液放冰箱中长期备用。

E. 0.12% H_2O_2

凝胶洗出后才加。随配随用。

② 染色配比

A∶B∶C∶D∶E＝20∶2∶5∶8∶5

③ 染色

将配好的染色液倒入白瓷盘内凝胶板上,37 ℃保温 30 min,酶带呈紫红色。取出漂洗后,7%醋酸中保存。

过氧化物酶同工酶显色 2～3 d更为清楚,在暗室用透光照相的方法效果较好。也可在

280 nm波长下用光密度计扫描定量。

⑹ 同工酶带相对迁移率计算

$$Rf=\frac{\text{酶带迁移距离}}{\text{溴酚蓝迁移距离}}$$

研究表明，过氧化物同工酶与植物抗寒性的关系极为密切，抗寒性强的品种的同工酶带一般比抗寒性弱的品种多 1～3条，且随着温度下降变化缓慢。

（五）丙二醛含量的测定

正常情况下，由于植物体内活性氧的产生与清除处于平衡状态，不会导致植物伤害。但在低温胁迫环境下，植物器官往往发生膜脂过氧化作用，丙二醛 (MDA)是膜脂过氧化的最终分解产物，常用作测定膜脂过氧化的指标。

丙二醛在酸性和高温度条件下，可以与硫代巴比妥酸 (TBA)反应生成红棕色的三甲川 (3, 5, 5—三甲恶唑 —2, 4—二酮)，其最大吸收波长在 532 nm。但是测定植物组织中 MDA时常受多种物质的干扰，其中最主要的是可溶性糖，糖与 TBA显色反应产物的最大吸收波长在 450 nm, 532 nm处也有吸收。植物遭受低温胁迫时可溶性糖增加，因此测定植物组织中 MDA—TBA反应物质含量时一定要排除可溶性糖的干扰。低浓度的铁离子能够显著增加 TBA与蔗糖或 MDA显色反应物在 532 nm和 450 nm处的消光度值，所以在蔗糖、MDA与 TBA显色反应中需一定量的铁离子，通常植物组织中铁离子的含量为 100～300 μg/g DW，根据植物样品量和提取液的体积，加入 Fe^{3+}的终浓度为 0. 5 μmol/L。

1. 直线回归法

MDA与 TBA显色反应产物在 450 nm波长下的消光度值为零。不同浓度的蔗糖 (0～25 mmol/L)与 TBA显色反应产物在 450 nm的消光度值与 532 nm和 600 nm处的消光度值之差呈正相关，配制一系列浓度的蔗糖与 TBA显色反应后，测定上述 3个波长的消光度值，求其直线方程，可求算糖分与 TBA显色反应产物在 532 nm处的消光度值。UV—120型紫外可见分光光度计的直线方程为：

$$Y_{532}=-0.00198+0.088D_{450} \quad \cdots\cdots ①$$

2. 双组分分光光度计法

据朗伯—比尔定律：D＝kCL，当液层厚度为 1 cm时，k＝D/C，k称为该物质的比吸收系数。当某一溶液中有数种吸光物质时，某一波长下的消光度值等于此混合液在该波长下各显色物质的消光度之和。

已知蔗糖与 TBA显色反应产物在 450 nm和 532 nm波长下的比吸收系数分别为 85. 40, 7. 40。MDA与 TBA显色反应产物在 450 nm波长下无吸收，故该波长的比吸收系数为 0，532 nm波长下的比吸收系数为 155，根据双组分分光光度计法建立方程组，求解方程得计算公式：

$$C_1\ (\mu mol/L)=11.71D_{450} \quad \cdots\cdots ②$$

$$C_2\ (\mu mol/L)=6.45\ (D_{532}-D_{600})-0.56D_{450} \quad \cdots\cdots ③$$

式中：C_1——可溶性糖的浓度

C_2——MDA的浓度

D_{450}, D_{532}, D_{600}——450 nm, 532 nm和 600 nm波长下的消光度值

0. 6%硫代巴比妥酸

称取硫代巴比妥酸，先加少量氢氧化钠（1 mol/L）溶解，再用 10%的三氯乙酸定容。

① MDA的提取

称取样品 1 g加入 2 mL 10% TCA和少量石英砂，研磨至匀浆，再加 8 mL TCA进一步研磨，匀浆在 4 000 r/min离心 10 min，上清液为样品提取液。

② 显色反应和测定

吸取离心的上清液 2 mL（对照加 2 mL蒸馏水），加入 2 mL0.6% TBA溶液，混匀物于沸水浴上反应 15 min，迅速冷却后再离心。取上清液测定 532 nm，600 nm和 450 nm波长下的消光度。

③ 计算含量

A. 直线方程法

按公式①求出样品糖分与 TBA显色反应产物在 532 nm处的消光度值 Y_{532}，用实测 532 nm的消光度值减去 600 nm非特异吸收的消光度值再减去 Y_{532}，其差值为测定样品中 MDA－TBA反应产物在 532 nm的消光度值。按 MDA－TBA反应产物在 532 nm处的毫摩尔消光系数为 155换算求出提取液中 MDA浓度。

B. 双组分分光光度计法

按公式③可直接求得样品提取液中 MDA的浓度。

用上述任一方法求得 MDA的浓度，根据样品的质量计算测定样品中 MDA的含量：

$$\text{MDA含量（μmol/g FW）}=\frac{\text{MDA浓度（μmol/L）}\times\text{提取液体积（mL）}}{\text{样品鲜重（g）}\times 10^{3}}$$

MDA含量变化与植物的抗寒性呈负相关，如果某一品种 MDA含量在低温时剧增出现得早，说明抗寒性较差；反之，抗寒性就强。

（六）可溶性糖含量的测定

可溶性糖一方面是原生质代谢可直接利用的原料，另一方面又增加了原生质的浓度，使冰点降低，又可缓冲细胞质过度脱水，保护细胞质胶体不致遇冷凝固，减少细胞内失水和结冰，因而可提高植株的抗寒性。

糖在浓硫酸作用下，可经脱水反应生成糠醛或羟甲基糠醛，生成的产物可与蒽酮反应生成蓝绿色糠醛衍生物，在一定范围内，颜色的深浅与糖的含量成正比，故可用于糖的定量。糖类脱水后与蒽酮反应生成的有色物质在可见光区的吸收峰为 630 nm，故在此波长下进行比色。

1. 试剂配制

蒽酮乙酸乙酯试剂

取分析纯蒽酮 1 g溶于 50 mL乙酸乙酯中，贮于棕色瓶中，在黑暗中可保存数星期，如有结晶析出，可微热溶解。

2. 标准曲线的制作

取 20 mL刻度试管 11支，从 0～10分别编号，按表 5－5加入溶液和水。

表 5－5　标准曲线的制作

管号	0	1, 2	3, 4	5, 6	7, 8	9, 10
100 mg/L蔗糖液 /mL	0	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0
水 /mL	2.0	1.8	1.6	1.4	1.2	1.0
蔗糖量 /μg	0	20	40	60	80	100

然后按顺序分别向试管中加入 0.5 mL蒽酮乙酸乙酯试剂和 5 mL浓硫酸，充分振荡，立即将试管放入沸水浴中，各试管均准确保温 1 min，取出后自然冷却至室温，以空白作参比，在 630 nm 波长下测其光密度，以光密度为纵坐标，以糖含量为横坐标，绘制标准曲线，并求出标准线性方程。

3. 可溶性糖的提取

将样品剪碎混匀，称取 0.10～0.30 g 分成 3份。分别放入 3支刻度试管中，加入 5～10 mL 蒸馏水，塑料薄膜封口，于沸水中提取 30 min（提取 2次），提取液过滤入 25 mL容量瓶，反复冲洗试管及残渣，定容至刻度。

4. 显色测定

吸取 0.5 mL样品液于 20 mL刻度试管中（重复 2次），加蒸馏水 1.5 mL，同制作标准曲线的步骤，按顺序分别加入蒽酮、浓硫酸溶液，显色并测定光密度。由标准线性方程求出糖的含量，按下式计算样品中糖的质量分数：

$$\text{可溶性糖质量分数} = \frac{C \times \frac{V}{a} \times n}{m \times 10^{6}}$$

式中：C——标准方程求得糖量，μg

a——吸取样品液体积，mL

V——提取液量，mL

n——稀释倍数

m——组织重量，g

5. 注意事项

该法的特点是几乎可以测定所有的糖类，不但可以测定戊糖与己糖，而且可以测所有寡糖类和多糖类，其中包括淀粉、纤维素等（因为反应液中的浓硫酸可以把多糖水解成单糖而发生反应），所以用蒽酮法测出的糖类含量，实际上是溶液中全部可溶性糖类总量。在没有必要细致划分各种糖类的情况下，用蒽酮法可以一次测出总量，省去许多麻烦，因此，有特殊的应用价值，但在测定水溶性糖类时，则应注意切勿将样品的未溶解残渣加入反应液中，不然会因为细胞壁中的纤维、半纤维素等与蒽酮试剂发生反应而增加测定误差。此外，不同的糖类与蒽酮试剂的显色深度不同，果糖显色最深，葡萄糖次之，半乳糖、甘露糖较浅，五碳糖显色更浅，故测定糖的混合物时，常因不同糖类的比例不同造成误差，但测定单一糖类时，则可避免此种误差。

四、作业思考题

1. 鉴定植物抗寒性的方法有哪些？各有何优缺点？

2. 干扰可溶性糖测定的主要因素有哪些？如何避免？

3. 过氧化氢酶与哪些生化过程有关？

4. 在进行超氧化物歧化酶（SOD）活力的测定时，为什么设照光和黑暗两个对照管？影响该实验准确性的主要因素是什么？应如何克服？

（冯宝春）

实验 41　植物抗旱性鉴定

水分亏缺是一种最普遍的影响植物生产力的环境胁迫，尽管蔬菜作物一般都在水源充足的地区栽培，但是通常蔬菜需水量大，而且几乎整个生育期对水分的要求都比较多；而果树大多栽培于丘陵、山地，更易受到水分亏缺的影响。因此，深入研究植物的抗旱性，进行抗旱育种显得特别重要。

抗旱育种的成败在很大程度上取决于拥有抗性资源的多少和深入研究的程度，因此，种质资源的抗旱性鉴定、评价与筛选是抗旱育种的关键环节，受到世界各国育种工作者的重视。进行抗旱性鉴定所采用的方法很多，主要包括田间直接鉴定法、干旱棚法、人工气候室法、盆栽法及室内模拟干旱条件法等。这些方法各有优缺点，适用于不同时期、不同目的抗旱性鉴定与研究。

本实验将以抗旱性存在差异的普通小麦品种为试材介绍植物抗旱性鉴定的主要方法和步骤。

一、试材及用具

1. 试材

小麦幼苗。

2. 用具

发芽箱、滤纸、培养皿、打孔器、天平、干燥器、电导仪、20 mL具塞刻度试管、双面刀片、恒温水浴锅、温度计、玻璃棒、研钵、过滤漏斗、容量瓶（50 mL）、移液管（2 mL，5 mL，10 mL）、高速台式离心机、分光光度计、微量进样器、荧光灯（反应试管处光照强度为 4 000 lx）、刻度吸管及 G_3 垂熔玻璃漏斗等。

二、方法步骤

（一）田间直接鉴定

当土壤干旱来临时，尤其在小麦孕穗至灌浆阶段发生干旱时，植株因失水而逐渐萎蔫，叶片变黄并干枯。在午后日照最强，温度最高的高峰过后，根据小麦叶片萎蔫程度分 5级记载。级数越小，抗旱性越强。

级别	分级标准
1	无受害症状
2	小部分叶片萎缩，并失去应有光泽，有较少的叶片卷成针状
3	大部分叶片萎缩，并有较多的叶片卷成针状
4	叶片卷缩严重，颜色显著深于该品种的正常颜色，下部叶片开始变黄
5	茎叶明显萎缩，下部叶片变黄至变枯

以上是根据凋萎程度定性鉴定品种的抗旱性，也可以把各品种分别种植于旱地（胁迫）和水地（非胁迫），测定旱地小区产量和水地小区产量，以下列公式定量评定品种的抗旱性。

$$\text{抗旱系数}\ (D_C) = \frac{\text{胁迫下的平均产量}\ (Y_D)}{\text{非胁迫下的平均产量}\ (Y_P)}$$

$$\text{抗旱指数}\ (D_i)=\text{抗旱系数}\ (D_c)\times\frac{\text{旱地产量}\ (Y_D)}{\text{所有品种}\ Y_D\ \text{的平均值}}$$

品种的抗旱系数或抗旱指数越大,其抗旱性越强。

(二)发芽试验鉴定

该方法是在室内人工模拟干旱条件,进行小麦芽期抗旱性鉴定。

1. 将供试种子置于 0.1%氯化汞溶液中,灭菌消毒 10～15 min。

2. 在直径 10 cm培养皿内放 4张定性滤纸,加入 15% PEG (聚乙二醇)溶液 6 mL或 17.6%蔗糖溶液 30 mL,每皿 1个品种,均匀整齐摆放健康子粒 30粒,重复 3～4次。

3. 将培养皿放入发芽箱内,25℃发芽 7 d。

4. 分别在萌发后第三天和第七天,测定种子的发芽势和发芽率,评定品种的抗旱性。也可以同时测定芽鞘长度、根长等,以反映品种的抗旱性强弱。

(三)离体叶片持水力测定

具体测定步骤如下:

1. 用万分之一电子天平称量小麦旗叶 5～10片 (或取幼苗展开顶叶若干片,分别称其鲜重),并对每份样品进行编号,重复 3～4次。

2. 将称过鲜重的叶片放入 25～30℃的干燥器中,在黑暗条件下干燥 2～6 h,再称量失水后叶片的重量。

3. 计算每份样品的失水率

$$\text{失水率}=\frac{\text{鲜重}-\text{失水后重量}}{\text{鲜重}}\times 100\%$$

计算出每一供试品种叶片的平均失水率,并进行比较。一般抗旱性强的品种叶片持水力高于抗旱性差的品种。

(四)游离脯氨酸含量的测定

用磺基水杨酸提取植物体内的脯氨酸,不仅大大减小了其他氨基酸的干扰,快速、操作简便,而且不受样品状态 (干或鲜样)限制。酸性条件下,脯氨酸与茚三酮反应生成稳定的红色缩合物,用甲苯萃取后,此缩合物在波长 520 nm处有一最大吸收峰。脯氨酸浓度的高低在一定范围内与其消光度成正比。

2.5%酸性茚三酮显色液

冰乙酸和 6 mol/L磷酸以 3∶2体积比混合,作为溶剂进行配制,茚三酮于 70℃下加热溶解,冷却后置棕色试剂瓶中,4℃下保存备用,两天内稳定。

1. 绘制脯氨酸标准曲线

(1) 称取 10 mg脯氨酸,蒸馏水溶解后定容至 100 mL,其质量浓度为 100 μg/mL。

(2) 取上述母液 0.0 mL,0.5 mL,1.25 mL,2.5 mL,5.0 mL,7.5 mL,10.0 mL分别放入 7个 50 mL容量瓶中,再分别加入蒸馏水定容至 50 mL,配成 0.0 μg/mL,1.0 μg/mL,2.5 μg/mL,5.0 μg/mL,10.0 μg/mL,15.0 μg/mL,20.0 μg/mL的系列溶液。

(3) 分别取上述溶液各 2 mL,加入已编号的 7个试管中,再分别加入 2 mL冰醋酸、4 mL酸性茚三酮试剂和 2 mL磺基水杨酸溶液。

(4) 摇匀后,用玻璃盖上试管口,在沸水浴中反应 2 h。

(5) 将试管取出,冷却至室温,然后向各试管中加入 4 mL甲苯,手工充分振荡后,静置约

10 min,红色反应产物被萃取到甲苯层。

⑹ 用滴管吸取红色的甲苯萃取液于比色皿中,在分光光度计 520 nm波长处测定吸光度。

⑺ 以脯氨酸含量为横坐标,吸光度为纵坐标绘制标准曲线。

2. 游离脯氨酸的提取

称取 0.3 g叶片鲜样 (来自经干旱处理和对照的不同材料),剪碎后放入具塞试管中,加 5 mL 3%磺基水杨酸溶液,加塞后在沸水浴中提取 10 min,过滤液待测。

3. 游离脯氨酸的测定

取提取液 2 mL于具塞试管中,加入 2 mL蒸馏水、2 mL冰醋酸和 4 mL酸性茚三酮试剂,摇匀后在沸水浴中加热显色 2 h,取出后冷却至室温,加入 4 mL甲苯,充分摇匀以萃取红色产物。静置约 10 min,吸取甲苯层,于分光光度计 520 nm波长处测定吸光度。

4. 计算样品中的脯氨酸含量

$$\text{脯氨酸含量 } (\mu g/g) = \frac{C \times \frac{V}{A}}{m}$$

或

$$\text{脯氨酸含量} = \frac{C \times \frac{V}{A}}{m} \times 10^{-6} \times 100\%$$

式中：C——由标准溶液查得脯氨酸质量,μg

V——提取液总体积,mL

A——测定液总体积,mL

m——样品重量,g

对许多植物的研究表明,在水分胁迫时,出现游离脯氨酸的大量积累,所以很多研究者主张可将脯氨酸积累的数量作为植物抗旱性的指标。但是,也有些研究表明,各种植物 (包括小麦) 品种在水分胁迫时,脯氨酸的积累有很大差异,有些抗旱品种在轻度干旱胁迫时脯氨酸含量并不增加,而一些不抗旱品种,器官组织内部水势下降快,游离脯氨酸积累也快。因此,用脯氨酸积累作为抗旱鉴定指标时,应结合其他抗旱鉴定指标一起评价。

(五) 甜菜碱含量的测定

甜菜碱最早在旱生植物宁枸杞中发现,已知有 12种,目前研究最多的是甘氨酸甜菜碱 (Glycine betaine),简称甜菜碱,它广泛存在于开花植物的各器官。甜菜碱在细胞内的积累可提高细胞的渗透调节能力,稳定细胞内大分子蛋白质与生物膜的结构和功能,还可保护细胞内许多重要代谢活动所需酶类的活性。作为一种非毒性的渗透调节剂,甜菜碱在植物抗逆生理中起着非常重要的作用,研究表明,甜菜碱的积累水平与植物抗胁迫能力成正比。

1. 溶液配制

① 雷氏盐溶液

精密称取 1.5 g雷氏盐,加水至 100 mL,用盐酸调 pH为 1,室温搅拌 45 min,须在用前配制。

② 甜菜碱提取液

甲醇 ∶氯仿 ∶水 =12∶5∶3 (V/V/V)。

③ 甜菜碱标准液

精密称取甜菜碱 100 mg,用蒸馏水移入 100 mL容量瓶中,待完全溶解后稀释至刻度,即得

质量浓度为 1 mg/mL的标准液。

2. 标准曲线绘制

将标准液按每毫升含 0.2 mg、0.4 mg、0.6 mg、0.8 mg、1.0 mg配制溶液，吸取以上溶液各 3.0 mL，水浴放置 3 h，用 G_3 垂熔玻璃漏斗过滤，3×3 mL 乙醚洗沉淀，待乙醚挥干，用 3×5 mL 70%丙酮溶液洗沉淀并转移至 25 mL容量瓶中，用 70%丙酮溶液补充至刻度，用 70%丙酮溶液作空白，在 525 nm处测其吸光度。

3. 甜菜碱的提取

称取 1 g左右小麦叶片（来自经干旱处理和对照的不同材料），加入 10 mL甜菜碱提取液，研磨，研磨液于温水浴中保持 10 min，冷却后于 20 ℃离心 10 min，收集上层水相，下层氯仿相再加入 10 mL提取液［甲醇 ∶氯仿 ∶水 ＝12 ∶5 ∶3（V/V/V）］；再离心，取上层水相，下层加入 4 mL 50%甲醇，离心，然后将上层水相合并，调 pH5～7，70 ℃蒸干，再用 5 mL水溶解。

4. 甜菜碱的测定

吸取待测液 3.0 mL，水浴放置 10 min，取出，滴加 5 mL雷氏盐溶液，冷水浴放置 3 h，用 G_3 垂熔玻璃漏斗过滤，乙醚洗沉淀，待乙醚挥干，用 70%丙酮溶液溶解沉淀并转移至 25 mL容量瓶中，用 70%丙酮溶液补充至刻度。70%丙酮溶液作空白，在 525 nm 处测其吸光度，由标准曲线中查出甜菜碱的含量。

植物体内超氧化物歧化酶活性、丙二醛含量及植物组织浸泡的电导率等生理、生化指标也可作为抗旱鉴定评价指标，具体测定方法见本教程的实验 40，在此不再详述。

三、作业思考题

1. 分析比较植物抗旱性鉴定的各种方法的有效性，你认为鉴定植物抗旱性时应注意什么问题？

2. 在进行游离脯氨酸含量的测定时，若改变萃取剂，则比色应做哪些改变？如何选择最适波长？如何选择最佳萃取剂？

（冯宝春）

实验 42　植物抗盐性鉴定

盐害是植物在含水溶性盐类较多的土壤上栽培，而造成的生长不良，产量下降，甚至死亡，是造成作物产量降低的主要环境因素之一。长期以来，土壤盐渍化对植物生产有着极为严重的影响，关于如何提高植物的抗盐性，增加在盐胁迫下作物的产量一直是人们关注的焦点。

植物的抗盐鉴定是一个非常复杂的问题，它不仅受到外界条件（如盐渍类型、生态环境、农艺耕作措施等）的制约，而且不同植物、不同品种、不同生育阶段的抗盐能力也不一样。从国内外的情况看，大体存在两类鉴定方法。第一类鉴定方法为直接鉴定法，可分为田间试验法、萌发试验法和盆栽试验法；第二类方法为间接鉴定法（也称生理鉴定法），主要包括膜透性的测定（电导法）、MDA（丙二醛）含量测定、可溶性糖含量测定及甜菜碱含量测定等。

本实验主要学习小麦抗盐性鉴定的方法与步骤。

一、试材及用具

1. 试材

小麦幼苗及种子。

2. 用具

培养皿、花盆、电导仪、20 mL具塞刻度试管、恒温水浴锅、玻璃棒、天平、离心机、研钵、可见分光光度计、刻度吸管（10 mL，5 mL）、离心管、容量瓶（25 mL）、加液器及 G_3 垂熔玻璃漏斗等。

二、方法步骤

（一）田间试验法

选取供试材料在适当程度的盐碱地上进行栽培试验，根据植株的生长状况及产量表现评定其耐盐性。

（二）萌发试验法

萌发试验法，即根据种子萌发和幼苗发育的表现来鉴定植物的耐盐性。

取培养皿，下垫两层滤纸，每皿 100粒种子，加 10 mL培养液（培养液 NaCl含量梯度依次为 0.0 g/L，3.0g/L，6.0g/L，9.0g/L，12.0g/L，15.0 g/L）。设 3个重复，每隔 12 h计数发芽种子数，计算发芽率及平均发芽时间，7 d后的发芽率记为最终发芽率，按下式计算平均发芽时间：

$$\text{平均发芽时间} = \frac{(n \times t)}{n}$$

式中：n——12 h内发芽种子数

t——从开始培养到发芽所需时间

在培养 25 d后，每培养皿随机选取 30株，计数正常幼苗的比率，同时，测定幼苗的根数、根长和苗高。

（三）盆栽试验法

试验设置 4个盐度处理，NaCl含量梯度依次为：0.0 mmol/L，50 mmol/L，150 mmol/L，200 mmol/L，将不同配比试验土装入直径 30 cm的花盆内备用。将供试试材移入，每个处理重复 10株。试验时，保持土壤含水量为饱和持水量的 75%，盐害 40 d后调查植株的盐害表现。按以下分级标准对处理单株进行调查：

级别	分级标准
1	植株生长受抑制不明显，个别叶片叶缘出现浅褐色斑
2	植株生长受抑制较轻，30%以下叶片出现褐斑
3	部分植株生长受抑制，50%叶片失绿
4	植株生长受抑制，生长基本停止，大多数叶片失绿
5	植株生长完全停止，大多数叶片枯死

按下式计算盐害指数：

$$\text{盐害指数} = \frac{(\text{受害级次} \times \text{每级株数})}{5\ (\text{最高级次}) \times \text{调查株数}} \times 100\%$$

根据细胞膜透性、丙二醛、可溶性糖及甜菜碱含量等指标也可鉴定植物的抗盐性，具体测定方法见本教程的实验 40，实验 41，在此不再详述。

三、作业思考题

1. 鉴定植物抗盐性的方法有哪些？请举例说明。

2. 参照小麦抗盐性鉴定的方法和步骤，以当地一种主要作物为试材设计一个抗盐性鉴定方案。

（冯宝春）

实验 43　植物抗涝性鉴定

水涝胁迫是由于土壤中水分过剩，造成土壤中的空气不足而引起植物生长发育障碍的现象，是我国多雨、土壤排水不良地区影响小麦等旱地作物产量的主要原因之一。

水涝胁迫主要限制植物光合作用与有氧呼吸，而促进无氧呼吸，产生乙醇等有毒中间产物，从而使植物发生某些适应性变化，如促进叶片衰老、脱落，茎直径增加，通气组织形成，产生不定根等，其本质是淹水引起生长素和乙烯相互作用，引起植物体各部分生长变化。生理代谢的变化也是植物适应淹水胁迫的一个重要方式，研究表明，涝渍降低植物体内超氧化物歧化酶和过氧化氢酶活性，削弱植物抵御自由基伤害的能力，抗涝性不同的植物根系乙醇脱氢酶（ADH）活性、叶片硝酸还原酶（NR）活性和细胞相对质膜透性等指标在涝渍胁迫下差异显著，可作为抗涝性评价指标。

由于植物抗涝机制的复杂性，用单个生理指标评价抗涝性有明显的局限性，因此必须综合分析植物形态结构、生长、生理代谢各指标之间的关系，才能科学评价植物的抗涝性强弱，为建立抗涝性品种筛选的指标体系和进一步的植物抗涝性育种提供科学依据。

植物抗涝性鉴定方法主要有两种：

1. 场圃鉴定法

就是将供试材料和对照品种分别种植于人为涝害处理的试验区和土壤湿度正常而其他条件基本相同的对照区，两区各设两次重复，通过对比观察各材料与对照品种有关性状的差异，使供试材料的抗涝性差异得到比较准确的鉴定。

2. 盆钵鉴定法

就是将各供试材料的种子或苗木分成两份，一份在正常条件下盆栽，另一份则种植于底部钻孔的装土盆钵内，到关键的生育期将盆钵浸于盛水的水箱内，以分别鉴定对涝害的反应。

本实验以玉米为试材，着重介绍乙醇脱氢酶、硝酸还原酶活性的测定方法及步骤，与抗涝性有关的其他生理指标如超氧化物歧化酶、过氧化氢酶活性及质膜透性的具体测定方法见本教程的实验 40，在此不再详述。

一、试材及用具

1. 试材

盆栽玉米，淹水处理时间为二叶一心期，水层保持 2 cm左右，持续 3 d，取初生根测定。

2. 用具

花盆、天平、研钵、离心机、微量进样器、荧光灯、试管、三角瓶、酸式滴定管、容量瓶（25 mL，50 mL，100 mL）、不连续双层直板凝胶电泳、电泳仪、20 mL注射器筒、恒温水浴锅、刻度试管、移液管（5 mL，2 mL，1 mL）、分光光度计、冰箱、电导仪及打孔器等。

二、方法步骤

(一) 乙醇脱氢酶 (ADH)活性测定

土壤渍水之所以危害植物是渍水造成的缺氧环境使植物根系和地上部的有氧呼吸受到抑制和无氧呼吸得到加强所致。作为植物对渍水 (或缺氧)胁迫的一种反应,常显示其体内乙醇脱氢酶 (ADH)活性的显著上升,同时其同工酶谱也会发生明显变化。因此,ADH 活性及同工酶的变化可作为植物遭受渍水胁迫的一种生理指标。

1. 乙醇脱氢酶活性的测定

(1) 样品制备

准确称取 2 g受渍水处理的幼苗根系于研钵中,加入 5 mL预冷的提取缓冲液 [50 mmol/L磷酸缓冲液, pH7.5, 5 mmol/L $MgCl_2$, 1 mmol/L苯甲基磺酰氟 (PMSF)],于冰浴中研磨,匀浆后用 4 层纱布过滤,滤液于 4 ℃下以 15 000 r/min离心 20 min,取上清液用于酶活性测定。

(2) 酶活性测定

酶反应液含 2.85 mL酶活性缓冲液 (15 mL 1.0mol/L Tris, pH8.0, 3 mL 0.01 mol/L NAD^+, 82 mL蒸馏水)和 100 μL酶液,混匀后加入 30 μL 95%乙醇启动反应,于 340 nm处测定 OD变化,以每分钟 ΔA_{340}增加 0.001为一个酶活性单位 (U),酶活性用 U/mg蛋白表示。

2. ADH同工酶聚丙烯酰胺凝胶电泳

(1) 酶液制备

称取一定量的根,加入 2～4倍体积的样品提取液 (含 50 mmol/L Tris—HCl, pH6.8, 5%巯基乙醇, 15%甘油和 1 mmol/L PMSF)于冰浴中进行研磨,匀浆后用 4层纱布过滤,滤液于 4 ℃下以 15 000 r/min离心 20 min,取上清液用于电泳分析。

(2) 装电泳槽

装置好垂直板电泳槽,用 1%热琼脂封好缝隙。

(3) 制胶板

分离胶和浓缩胶的组成见表 5—6。按配方比例混合分离胶中除过硫酸铵和 TEMED以外的各种贮备液,混匀后用真空泵抽去抑制聚合的氧气,最后加入催化剂过硫酸铵和 TEMED,混匀后立即将凝胶液沿胶模子的一块玻璃板内壁缓缓注入玻璃槽中,注胶过程中需防止气泡产生,胶液加到离玻璃板顶部约 3 cm处,将电泳槽垂直放置,立即用注射器小心注入蒸馏水,使胶表面覆盖 3～4 mm水层,静置 1 h聚合,然后去水层,吸干。用同法制备浓缩胶,在加入过硫酸铵和 TEMED后立即将胶液注入上述制备好的分离胶上,胶液加至胶室的顶部,插入梳子,静放聚合。胶聚合后,小心取出梳子,向样品槽内加入电极缓冲液。

表 5—6 分离胶和浓缩胶的组成

贮备液	分离母胶	分离胶缓冲液	浓缩母胶	浓缩胶缓冲液	48%甘油	蒸馏水	10%过硫酸铵	TEMED	总体积
7%分离胶	2.30 mL	2.50 mL	—	—	2.50 mL	2.70 mL	30 μL	25 μL	10 mL
5%浓缩胶	—	—	0.66 mL	1.0 mL	1.0 mL	1.28 mL	50 μL	20 μL	4 mL

① 分离母胶

25 mL含 7.5 g丙烯酰胺和 N,N′—甲叉丙烯酰胺 (Bis) 0.128 g。

② 浓缩母胶

10 mL含 3 g丙烯酰胺和 0.042 g Bis。

③ 分离胶缓冲液

Tris—HCl 1.5 mol/L，pH 8.7。

④ 浓缩胶缓冲液

Tris—HCl 0.5 mol/L，pH 6.8。

⑤ 电极缓冲液

Tris—HCl 10 mmol/L，甘氨酸 77 mmol/L，pH 8.3。

⑥ 10%过硫酸铵。

⑦ 48%甘油。

⑧ TEMED。

(4) 加样与电泳

每点点样 15～20 μL(蛋白含量 10～20 μg)于电泳槽内加电极缓冲液，加 1～2滴 0.005%溴酚蓝。电泳开始 1 h为 7 mA，以后为 15 mA，电泳温度最好控制在 4 ℃左右(置冰箱内)。

(5) 显色

将电泳后的胶取下放在染色液[含 3.75 mL 1 mol/L Tris—HCl，pH 8.0，1.35 mL 95%乙醇，15 μL 144 μmol/L氮蓝四唑(NBT)，30 mg酚嗪二甲酯硫酸盐(PMS)，23.9 mg NAD^+，用蒸馏水定容至 150 mL]中，于黑暗下反应 30 min，至酶带颜色显示至理想强度，ADH酶带呈棕褐色，取出已显色的胶，用蒸馏水漂洗，放在 7%醋酸中于黑暗下贮存。

(二) 硝酸还原酶(NR)活性测定

硝酸还原酶(NR)是植物氮素同化的关键酶，它催化植物体内的硝酸盐还原为亚硝酸盐：

$$NO_3^- + NADH + H^+ \xrightarrow{NR} NO_2^- + NAD^+ + H_2O$$

产生的亚硝酸盐与对—氨基苯磺酸(或对—氨基苯磺酰胺)及 α—萘胺(或萘基乙烯二胺)在酸性条件下定量生成红色偶氮化合物，在 540 nm波长下有最大吸收峰，可用分光光度法测定。硝酸还原酶活性可由产生的亚硝态氮的量表示。一般以 $\mu gN \cdot g^{-1}\ FW \cdot h^{-1}$为单位。NR的测定可分为活体法和离体法。活体法步骤简单，适合快速、多组测定；离体法复杂，但重复性较好。

1. 活体法

(1) 试剂配制

① 亚硝酸钠标准液

称取分析纯 $NaNO_2$ 0.100 0 g水溶后定容至 100 mL，吸取 5 mL用水稀释定容至 1 000 mL，即为每 mL含 $NaNO_2$ 5 μg(亚硝态氮近似 1 μg/mL)的标准液。

② 0.1 mol/L pH 7.5的磷酸缓冲液

K_2HPO_4 19.24 g KH_2PO_4 2.2 g加水溶解后定容至 1 000 mL。

③ 1% (m/V)对—氨基苯磺酸溶液

称取 1.0 g加入 25 mL浓 HCl中，用蒸馏水定容至 100 mL。

④ 0.2% (m/V) α—萘胺溶液

称取 0.2 g α—萘胺溶于 25 mL冰醋酸中，用蒸馏水定容至 100 mL。

⑤ 30%三氯乙酸溶液

75.0 g三氯乙酸水溶后定容 250 mL。

⑥ KNO_3 (0.1 mol/L)、异丙醇 (1%，V/V)、磷酸缓冲液 (0.1 mol/L)混合液

称 3.03 g KNO_3 溶于 300 mL 0.1 mol/L的磷酸缓冲液中，再加 3 mL异丙醇混匀。

(2) 标准曲线制作

取 7支洁净烘干的 15 mL刻度试管按表 5－7顺序加试剂，即配成 0～2.0 μg的系列标准亚硝态氮溶液。摇匀后在 30 ℃保温箱或恒温水浴中保温 30 min，然后，在 540 nm波长下比色。以亚硝态氮 (μg)为横坐标，光密度值为纵坐标绘标准曲线或建立回归方程。

表 5－7 标准曲线的制作

试剂 /mL	1	2	3	4	5	6	7
亚硝酸钠标准液	0	0.2	0.4	0.8	1.2	1.6	2.0
蒸馏水	2.0	1.8	1.6	1.2	0.8	0.4	0
1%对 －氨基苯磺酸	4	4	4	4	4	4	4
0.2% α－萘胺	4	4	4	4	4	4	4
每管含 NO_2^- 质量 /μg	0	0.2	0.4	0.8	1.2	1.6	2.0

(3) 取样

将材料洗净，用蒸馏水冲洗，滤纸吸干。称取样品 3份，每份 0.5～1.0 g放入试管并编号。

(4) 反应

向各试管加入 KNO_3、异丙醇、磷酸缓冲液混合液 9 mL，其中一管立即加 1.0 mL三氯乙酸混匀作对照。然后将所有试管置真空干燥器中接真空泵抽气，反复几次直至叶片沉在管底。将各试管置 30 ℃下于黑暗处保温 30 min，分别向处理管加 1.0 mL三氯乙酸，摇匀终止酶活性。

(5) 比色

将各试管静置 2 min，吸取上清液 2 mL加入另一组试管，以对照管做参比，按标准曲线做法进行显色测定，并计算酶活性。

$$\text{酶活性 (μgN·g}^{-1}\text{FW·h}^{-1}\text{)} = \frac{\dfrac{\text{查标值 (μg)}}{\text{取样量 (mL)}} \times \text{反应液总量 (mL)}}{\text{样品质量 (g)} \times \text{时间 (h)}}$$

2. 离体法

(1) 试剂配制

① 0.1 mol/L pH7.5的磷酸缓冲液。

② 0.1 mol/L KNO_3 磷酸缓冲液。

③ 1% (m/V)对 －氨基苯磺酸溶液。

④ 0.2% (m/V) α－萘胺溶液。

上述溶液配法同活体法。

⑤ $NADH_2$ 溶液

称取 2.0 mg $NADH_2$ 溶于 1 mL 0.1 mol/L的磷酸缓冲液中 (冰箱贮存可用 1星期)。

⑥ 提取缓冲液 (25 mmol/L的磷酸缓冲液、5 mmol/L半胱氨酸、5 mmol/L EDTA－Na_2 混合液)

取 250 mL 0.1mol/L磷酸缓冲液，加半胱氨酸 0.61 g EDTA－Na_2 1.86 g溶解后用 KOH溶

液调 pH 至 7.5,定容至 1 000 mL。

⑵ 酶液制备

取材料 2 g洗净剪碎,放在研钵中置低温冰箱冷冻 30 min。取出在冰浴中加少量石英砂和提取缓冲液 (玉米、小麦分别按每克鲜重 1 mL和 2 mL分两次加入)。研磨为匀浆,低温离心 5 min(4 000 r/min)。上清液即为粗酶提取液。上述操作尽量在冰浴中进行。

⑶ 测定与计算

取 0.4 mL粗酶提取液,1.2 mL 0.1 mol/L KNO_3 磷酸缓冲液,0.4 mL $NADH_2$ 溶液加入备好的刻度试管中混匀,在 30 ℃下保温 30 min,对照不加 $NADH_2$,以 0.4 mL蒸馏水代替。保温后立即加 1 mL对 -氨基苯磺酸溶液终止反应,加 1 mL α-萘胺溶液,显色 20 min,在台式离心机上离心 10 min,上清液在分光光度计上测波长 540 nm处光密度。标准曲线制作和结果计算同活体法。

⑷ 注意事项

① 硝酸盐还原过程应在黑暗中进行,以防止亚硝酸盐还原为氨。加异丙醇可增加组织对 NO_3^- 和 NO_2^- 的透性,厌氧条件可防止氧竞争还原毗啶核苷酸。

② 取样前材料应照光 3 h以上,大田取样在上午 9∶00后为宜,阴雨天不宜取样。取样部位应尽量一致。

③ 配好的 KNO_3 磷酸缓冲液应密闭低温保存,否则易滋生微生物将 NO_3^- 还原,使对照吸光值偏高。

④ 从显色到比色时间要一致,过短或过长对颜色都有影响。

三、作业思考题

1. 鉴定植物抗涝性的方法有哪些?
2. 测定硝酸还原酶活性的材料取样前为什么需要一定时间的光照?
3. 在进行硝酸还原酶活性测定时,活体法和离体法测定中影响实验结果的最大因素各是什么? 应如何注意?

(冯宝春)

实验 44 植物耐热性鉴定

干热风和夏秋高温是影响植物生长的常见逆境因子,严重制约了小麦、蔬菜等作物的生产,影响了它们的产量和品质。因此,植物耐热性研究和耐热性育种备受研究工作者关注。对此,我国科技工作者已做了许多有益的工作,对热胁迫下作物的生育、生理及生化变化做了较多的研究,并探索出了一些针对不同作物进行耐热性鉴定的方法。

植物的耐热性鉴定分为田间自然鉴定和室内鉴定两种。鉴定指标可分为形态指标和生理生化指标,例如萝卜叶的外部形态是其品种耐热性鉴定的重要指标,而高温结球性是耐热性大白菜生产的先决条件,对于食用果荚、种子的蔬菜作物来说,高温下配子体能保持正常的授粉受精能力,是确定其具有较强抗性的一个重要指标。

本实验主要学习白菜耐热性鉴定的方法和步骤。

一、试材及用具

1. 试材

白菜幼苗。

2. 用具

电子天平、离心机、研钵、紫外可见分光光度计、10 mL刻度吸管、10 mL离心管、电导仪、20 mL具塞刻度试管、恒温水浴锅、温度计、玻璃棒、试管、过滤漏斗、容量瓶（50 mL）及移液管（2 mL，5 mL）等。

二、方法步骤

（一）白菜结球期田间高温试验鉴定

按小区面积为 5 m^2，株、行距均为 50 cm，每小区种植 20株，随机区组排列，3次重复，将白菜播种于塑料日光温室中，苗期培养温度为 25 ℃左右，根据气温情况调节放风量，以维持室内适宜的高温环境。试验期间观察结球状况。

（二）室内鉴定

1. 试材处理

选取整齐一致的白菜幼苗置于生长箱内进行高温处理，温度设定为：30 ℃，31 ℃，32 ℃，33 ℃，34 ℃，36 ℃，38 ℃，40 ℃，光照强度为 10 000 lx左右，光周期为 14 h/10 h（昼/夜）。对照处理的温度为 25 ℃，处理后植株的恢复温度亦为 25 ℃。

2. 热害症状调查

在处理后的第 0，2，4，6，8，10，12天及恢复后的第 2，4天调查热害症状，计算热害指数。热害症状分级如下：

级别	分级标准
0	植株生长正常，没有热害出现
1	植株新叶叶缘轻度反卷
2	新叶轻度皱缩，叶缘反卷
3	叶片中度皱缩，叶片反卷
4	叶片严重皱缩反卷，叶片呈细条状

热害指数按下式计算：

$$\text{热害指数} = \frac{\text{各株级数}}{\text{最高级数} \times \text{总株数}} \times 100$$

另外，亦可根据丙二醛、游离脯氨酸含量及质膜透性等生理、生化指标评价植物的耐热性，具体测定方法见本教程实验 40，实验 41，在此不再详述。

三、作业思考题

鉴定植物耐热性的方法都有哪些？试举例说明。

（冯宝春）

第六章　植物倍性及分子生物学鉴定技术

实验 45　植物多倍体鉴定技术

多倍体广泛分布于植物界，如普通小麦是异源六倍体，棉花是四倍体，栽培草莓是八倍体等，多倍体产生途径除自然发生外，化学药剂诱导是很有效的途径。不管以何种方式产生，检测、鉴定多倍体都显得很重要和迫切。

鉴定多倍体，可采用间接和直接的方法。间接方法包括形态学和细胞学的观察，直接法是直接检测试材染色体的数目。一般来讲，多倍体植物在形态学和细胞学上的特征表现为：气孔、花器、花粉粒、种子、果实甚至叶片等明显变大，单位面积叶片上的气孔数目减少而密度降低等。考虑到染色体观察、记数较为繁琐，首先对试材从形态学和细胞学上来初步判断是否为多倍体，然后再对初步断定为多倍体的试材观察、记录染色体数目是否真正地发生了倍性的变异，从而最终确定是否为多倍体。

芽变选种是无性繁殖植物育种的一种有效途径，芽变材料多以嵌合体的形式存在，特别是多倍体芽变。通过检测梢端分生组织 LⅠ，LⅡ，LⅢ3层细胞的细胞、细胞核及核仁的大小，可以鉴定芽变材料倍性嵌合体的类型。

本实验学习多倍体鉴定的基本方法。

一、试材及用具

1. 试材

玉米、小麦、棉花、草莓、番茄及苹果等。

2. 用具

显微镜、剪刀、培养皿、载玻片、盖玻片、吸水纸、镊子、纱布、酒精灯、物镜测微尺及目镜测微尺等。

3. 试剂

⑴ 卡诺氏固定液

冰醋酸 1份，加纯 (或 95%)酒精 3份，混匀，现用现配。

⑵ 醋酸纤维素液

称取 10 g醋酸纤维素，加入到 100 mL的丙酮溶液中，用玻棒搅拌数分钟至醋酸纤维素全部溶解。

⑶ 醋酸洋红染色剂

取 45 mL冰醋酸，加入 55 mL蒸馏水，加热至沸腾，慢慢加入 2 g洋红，煮沸约 5 min，冷却后加入 2% 硫酸亚铁。过滤，贮于棕色瓶中。

⑷ 解离液

铬酸 2 g,浓硫酸 8 mL,浓硝酸 3 mL,蒸馏水 89 mL,充分混匀。

二、方法步骤

(一) 间接方法

1. 形态学观察

观察试材的形态学特征,例如叶片、果实、种子、花器等是否有较明显的增大现象,如果肉眼就能观察到明显的增大现象,说明试材很有可能是多倍体。不论形态上是否存在明显变异,还需观察、检测细胞学上的变化。

2. 细胞学观察

⑴ 检测气孔大小和密度

对叶背无茸毛的材料,可直接观察。取叶片用卡诺氏固定液固定,撕取叶片下表皮置载玻片上,滴上 1～2滴醋酸洋红染色剂染色 1～2 min,盖上盖玻片,用吸水纸吸去多余的染液,在显微镜下观察记录气孔保卫细胞长度、宽度和气孔的密度。

对叶背有茸毛的材料,用印膜法观察。选取生长健壮叶片,于叶背中部 (避开叶脉)涂上一层均匀醋酸纤维素液,约 5 min后形成一层薄膜,用镊子揭下薄膜,就除掉了叶背的茸毛。然后再往叶背涂一层醋酸纤维素液,注意要涂匀,在室内晾 3～5 min,用镊子取下薄膜,置于载玻片上,加蒸馏水或醋酸洋红染色剂 1～2滴,盖上盖玻片,在显微镜下观察气孔的大小和密度。

对叶背茸毛多的材料,用解离液法观察。先用醋酸纤维素液去掉茸毛,然后把叶片剪成小块放入解离液中浸泡,直至表皮边缘与叶肉脱离翘起,放入清水中漂洗,揭下表皮,置于载玻片上,用醋酸洋红染色,盖上盖玻片,镜检。

把临时制片放在低倍镜下找到气孔后,换用高倍镜,用目镜测微尺测量保卫细胞大小,求 30个气孔大小的平均值。然后统计计算每个视野中气孔的数目,移动载玻片,换另外的视野,进行10次记数,用物镜测微尺测量视野的直径,计算出每个视野的面积,求出单位叶面积上的气孔的数目,即为气孔的密度。

⑵ 四分体

取始花期花蕾 (小孢子母细胞减数分裂末期——四分体花粉粒)放到卡诺氏固定液中固定 2 d,更换到 70% 酒精中保存。用解剖针从花蕾中挑出花药置于载玻片上,滴一滴醋酸洋红染色剂,并将花药横向切断,从一端向切口处轻轻挤压花药,使花粉母细胞从切口处逸出,然后用镊子除尽花药壁等杂物。盖上盖玻片,用吸水纸吸去多余染液,镜检,测定 30个四分体直径,求出平均值。如果四分体的直径增大,并伴有异常分体出现,则很可能是多倍体。

注意,取适当时期的花蕾,是观察四分体的关键,不同植物取材的时期不同。如玉米在大喇叭口期,此时花序先端小穗颖长 4 mm左右,花药长 23 mm,每分枝中上部小穗发育最早;小麦在旗叶与下一叶片的叶耳距约 2～3 cm时取材较好;棉花现蕾后即进入减数分裂期,由于其花序分节着生,常按花蕾的长度取材,如陆地棉整个花蕾长 3～5 mm时取材较好;玫瑰香葡萄花序 9 cm左右,花序上展叶 3～4片时取样较适宜,此外,葡萄还可以以每一花蕾的花冠长度与花萼和花托长度之比在 1/1～2/1之间作为衡量减数分裂时期的外观指标。取材一般在上午 9∶00—10∶00,于固定液中固定。

⑶ 测定花粉粒大小

取试材的花粉粒,先在固定液中固定,再在显微镜下观察花粉粒大小及萌发孔数量。如果花粉粒明显增大或大小不均一,花粉粒上萌发孔数量增加,说明很可能发生了多倍性的变异。

⑷ 梢端切片

把试材的梢端分生组织做成石蜡切片,镜检,测定各层(LⅠ,LⅡ,LⅢ)的细胞、细胞核及核仁大小。如果某层的细胞、细胞核、核仁变大,说明该层发生了多倍性的变异。如陈学森等(1991)发现,同质体的多倍体,如苹果的三倍体品种陆奥、世界一、北斗等通过杂交育成的品种为同质体,在 3个组织发生层的细胞中,细胞、细胞核及核仁大小 3个指标没有显著性差异;但与二倍体的亲本比较,三倍体品种梢端 3层的细胞、细胞核及核仁明显增大。对芽变来源的材料,如果梢端 3层细胞的某一层的细胞、细胞核及核仁明显增大,很可能该层细胞所衍生的组织将发生多倍性的变异。

(二)直接方法

对于采用间接方法初步断定为多倍体的材料,还应鉴定其染色体数目是否增多,以提供最直接的证据。可以用从田间挖取刚刚长出的幼嫩根尖或室内培养的根尖,具体方法如下:

1. 预处理

剪取根尖在上午 10∶00左右为好。为了获得更多的中期分裂相,同时使染色体相对缩短,便于染色体分散和记数,可对根尖进行冰冻预处理,即将根尖浸泡在蒸馏水中,置 4℃冰箱中冰冻 24 h,这种方法对染色体无破坏作用,且染色体缩短均匀,效果良好。

2. 固定

处理后的根尖用蒸馏水冲洗两次后,转移到 70%酒精冰醋酸(3∶1)的固定液中,在 4~15℃固定 20~24 h,再用 70%酒精冲洗两次转入 70%酒精中保存。

3. 解离

把根尖用蒸馏水冲洗两次,放入先在 60℃水浴中预热的 1 mol/L盐酸中,60℃恒温处理 10~15 min,当根尖透明呈黄色时取出;然后把根尖置于 2.5%果胶酶和 2.5%纤维素酶等量混合液(pH 5~5.5)中,在室温 18~28℃条件下处理 2~3 h;再将根尖置 5 mol/L盐酸中处理 5~10 min。

4. 后低渗

把根尖放在蒸馏水中冲洗 2~3次 (约 10 min),一定要冲洗干净,否则影响染色,冲洗后的根尖保存在 70%酒精中备用。

5. 染色与压片

取一根尖在吸水纸上吸去多余的溶液,然后放在干净的载玻片中央,用刀片把分生组织切下,将其切成薄片,越薄越好,滴 1滴醋酸洋红染色液,盖上盖玻片,一手固定盖玻片,另一手用镊子尖或解剖针柄轻敲盖玻片,使材料溃散均匀,继续轻敲,使材料呈云雾状即可。

6. 镜检

压好的片子先在低倍镜下镜检,再用高倍镜镜检,检查、记录有丝分裂中期的染色体的数目。

三、作业思考题

1. 简述多倍体鉴定方法的原理。

2. 如何用检测染色体数目的方法来鉴定多倍体？

3. 通过实验，比较气孔的大小和密度、花粉粒的大小与植物倍性的关系。

（陈晓流）

实验 46　植物基因组 DNA 及总 RNA 提取技术

幼嫩组织的细胞处于旺盛的分裂阶段，细胞核较大而细胞质较少，核酸浓度高，且内含物少，次生代谢产物少，蛋白质及多糖类物质相对较少，在 SDS或 CTAB物质存在时，经机械研磨，使细胞破裂并释放出内含物，提取的 DNA、RNA的产量高，纯度好。

提取 DNA所用的提取液、吸头、离心管等需要高压灭菌以灭活 DNase。RNase存在于所有的生物中，并且耐沸腾、蒸煮，所以在提取 RNA的过程中要防止 RNA酶污染，用具如吸头、离心管、水、药品等都要经 RNase的抑制剂 DEPC处理，即每 100 mL溶液中加入 0.1～0.2 mL DEPC溶液，37 ℃过夜，然后高压灭菌 20 min以灭活 DEPC。由于 RNA容易降解，所有的提取步骤都在冰浴中进行。

DNA（RNA）定量分析可用紫外光谱分析，原理是 DNA（RNA）分子在 260 nm处有特异的紫外吸收峰，且吸收强度与 DNA（RNA）的浓度成正比。此外，还可通过琼脂糖凝胶电泳上显示的 DNA（RNA）带的亮度来分析，因为 EB作为一种荧光染料，能插入 DNA（RNA）的碱基对平面之间而结合于其上，在紫外光的激发下产生荧光，DNA（RNA）分子上 EB的量与 DNA分子的长度和数量成正比。在电泳时加入已知浓度的 DNA（RNA）Marker作为 DNA（RNA）相对分子质量及浓度的参考，样品 DNA（RNA）的荧光强度就可以大致表示 DNA（RNA）量的多少。这种方法的优点是简便易行，可结合琼脂糖凝胶电泳分析 DNA（RNA）样品的完整性来进行，缺点是不太准确。

本实验介绍植物 DNA、RNA提取及检测的方法步骤。

一、试材及用具

1. 试材

植物幼嫩组织（如幼叶、花器、幼根）。

2. 用具

离心机、离心管、紫外分光光度计、微量移液器、吸头、吸水纸、水浴锅、冰箱、研钵、液氮罐、电子天平、pH计、高压灭菌锅、一次性手套和口罩、电泳仪及电泳槽等。

3. 试剂

（1）提取 DNA缓冲液（CTAB法）

2% CTAB（m/V），100 mmol/L Tris－HCl pH 8.0，20 mmol/L EDTA pH 8.0，1.4 mol/L NaCl，2% PVP（灭菌后加入 2% PVP，使之充分溶解）。在研磨叶片前加入 1%（V/V）β－巯基乙醇。

（2）CTAB提取 RNA缓冲液

2% CTAB（m/V），2% PVP（m/V），25 mmol/L EDTA，100 mmol/L Tris－HCl pH 8.0，2.0 mol/L NaCl，0.5 g/L Spermidine（亚精胺）。灭菌后加入 2%（V/V）β－巯基乙醇。

（3）SSTE buffer

1.0 mol/L NaCl, 0.5% SDS, 10 mmol/L Tris—Cl pH 8.0, 1 mmol/L EDTA。

(4) TE (pH 8.0)

称取 1.211 g Tris, 0.372 g EDTA—Na_2, 先用 800 mL 蒸馏水加热搅拌溶解, 用盐酸调 pH 8.0, 再用蒸馏水定容至 1 000 mL。高压灭菌 20 min。

(5) 氯仿/异戊醇 (24∶1, V/V)

将氯仿和异戊醇按体积 24∶1的比例混匀, 置棕色瓶中, 4 ℃保存。

(6) 酚∶氯仿∶异戊醇 (25∶24∶1)

按饱和酚、氯仿、异戊醇体积比为 25∶24∶1比例混匀, 置棕色瓶中, 4 ℃保存。

(7) 5×RNA 电泳缓冲液的配制

依次加入以下成分: 10.46 g MOPS, 1.7 g乙酸钠, 0.93 g EDTA, 调 pH 7.0, 定容到 500 mL。

(8) RNA 加样缓冲液

1 mmol/L EDTA pH 8.0, 0.25% 溴酚蓝, 0.25% 二甲苯青, 50% 甘油, 高压灭菌。

二、方法步骤

(一) 植物基因组 DNA 提取

1. 提取 DNA

在提取过程中用到的吸头、研钵、提取缓冲液等先高压灭菌 20 min, 取出后待用, 按照下述步骤提取基因组 DNA。

(1) 在 65 ℃水浴中预热 CTAB提取液。

(2) 在液氮中研磨 2～3 g新鲜或 —20 ℃冷冻的样品材料。注意, 要研成很细的粉末, 动作要快。

(3) 迅速加入 CTAB提取液, 混匀, 倒入离心管中, 65 ℃水浴 30 min。其间不断轻轻摇动离心管。

(4) 加入 5 mol/L的乙酸钾充分混匀, 在冰浴中放置 30 min, 4 ℃ 12 000 r/min离心 5 min, 吸上清。

注意, 对于幼嫩叶片此步可以省略, 对成熟的老叶片需采用。

(5) 加入等体积的氯仿/异戊醇, 混匀, 放置 10 min, 12 000 r/min常温离心 10 min。

(6) 吸上清到新离心管中, 用氯仿/异戊醇重复抽提一次。

(7) 吸上清到新离心管中, 加入 2.5倍体积的无水乙醇, 混匀, —20 ℃放置 10～30 min沉淀 DNA。

(8) 10 000 r/min常温离心 10 min。

(9) 倒掉乙醇, 用 400 μL 70% 乙醇洗沉淀, 然后用 400 μL 100% 乙醇洗沉淀, 吹干后用 200～500 μL TE溶解 DNA。

(10) 溶解后的 DNA再用氯仿/异戊醇抽提一遍。

(11) 吸上清到新离心管中, 加入 2.5倍体积的无水乙醇, 混匀, —20 ℃放置 10～30 min, 沉淀 DNA。

(12) 离心, 弃上清, 70% 乙醇洗沉淀, 再用 100% 乙醇洗沉淀, 吹干后, 用 200 μL TE 溶解 DNA。用紫外分光光度计测定浓度后, 按要求的质量浓度 (如 200 μg/μL) 再向 DNA溶液中加入

适量 TE。在 -20 ℃冰箱中可长期保存。

注意,提取的 DNA的质量好坏由它的长度和纯度决定。轻轻操作 DNA溶液和快速冷冻植物组织对减轻机械剪切力和核酸酶切割非常重要,不能振荡,不能使用太细口的吸头,也不能吸得太快。多糖、蛋白质及木本植物中的酚类物质是植物 DNA抽提中的主要污染物,提取材料要尽量使用幼嫩叶片。如果试材较老,多糖含量高,在提取缓冲液中应提高 β-巯基乙醇的用量,且在用氯仿/异戊醇抽提之前先用酚∶氯仿∶异戊醇抽提一遍,这样去除蛋白较为彻底。所得 DNA应为无色或灰白色,若呈褐色则有多酚类物质污染;对多糖含量高的材料,提取液中 CTAB的浓度可增至 3%或更高。

2. 琼脂糖电泳检测 DNA

制作 1%的琼脂糖凝胶,吸取提取的 DNA溶液 5 μL,电泳检测,具体方法见实验 47。用 λDNA做相对分子质量大小的 Marker,如果带型不弥散,在与 Marker 20 kb的带的相应位置出现整齐明亮的条带,说明基因组 DNA完整,没有降解。

(二)植物总 RNA提取

1. 提取 RNA

(1) 65 ℃水浴中预热 15 mL CTAB提取液。

(2) 液氮中研磨 2~3 g新鲜或 -70 ℃冷冻的材料。

(3) 转移样品至有 CTAB提取液的离心管中,立即激烈涡旋 30 s,短时放回 65 ℃水浴中(4~5 min)。

(4) 加入等体积的氯仿/异戊醇并涡旋混合,10 000 r/min常温离心 15 min。

(5) 将上清转移至一新离心管,重复抽提一次。

(6) 将上清转移至一新离心管中,加入 8 mol/L LiCl,使 LiCl的终浓度为 2 mol/L,即加入 1/3体积的 LiCl,4 ℃下沉淀过夜(最多 16 h)。

(7) 4 ℃离心 1 h(全速),弃上清,用 500 μL 70%乙醇洗沉淀,然后用 500 μL 100% 乙醇洗沉淀。

(8) 用 500 μL SSTE溶解沉淀,转移至 1.5 mL离心管中,加入等体积的氯仿/异戊醇抽提一次。

(9) 加入 2×体积的无水乙醇,在 -70 ℃沉淀 30 min或 -20 ℃沉淀 2 h。

(10) 4 ℃离心 20 min沉淀 RNA(全速)。

(11) 先用 400 μL 70%乙醇洗沉淀,然后用 400 μL 100%乙醇洗沉淀,吹干后用 65 μL DEPC水溶解 RNA。

2. 用 DNase处理提取的 RNA

(1) 用 65 μL DEPC水溶解 RNA沉淀。

(2) 加入

10×DNase assay buffer	5 μL
RNase inhibitor	1.0 μL
DNase Ⅰ	1.5 μL

(3) 37 ℃水浴 20 min。

(4) 调整样品体积至 250 μL(加入 175 μL DEPC水)。

(5) 加入 1/10体积 3 mol/L NaAc(pH5.2),即 25 μL,颠倒管子或涡旋混匀。

⑹ 加入 2×体积冷的无水乙醇，混匀后，在 -20 ℃贮存 30 min。

⑺ 4 ℃离心 20 min，沉淀 RNA (全速)。

⑻ 用 70%乙醇洗沉淀，然后用无水乙醇洗沉淀。

⑼ 吹干后，用 50 μL DEPC水溶解 RNA。置 -70 ℃冰箱中保存。

3. 电泳检测 RNA

⑴ 配制 1.2%的琼脂糖凝胶 (20 mL)

称取琼脂糖 0.24 g，加 DEPC处理的 ddH_2O 12.04 mL，5×RNA 电泳缓冲液 4 mL，电炉加热融化琼脂糖，冷却至 55 ℃，加入甲醛 1.96 mL，冷却后倒胶。

⑵ RNA电泳

取去离子甲酰胺 10 μL，甲醛 1.5 μL，10×RNA Buffer 2 μL，RNA (2～4 μg <10 μL) 混合液，65 ℃加热 15 min，迅速在冰浴中冷却片刻，然后加入 3 μL RNA 加样缓冲液和 0.5 μL EB，上样电泳。电泳 Buffer为 1×RNA buffer。

出现的电泳条带有两条，是两条最大的核糖体 RNA (rRNA)分子，即 18 S和 28 S rRNA，较小的 RNA也很丰富但看不到，因为太小，跑出了凝胶的边界。多数细胞中的信使 RNA (mRNA)经 EB染色后不足以形成可见的带。只要 18 S和 28 S rRNA带亮，且 28 S rRNA带的亮度大约为 18 S rRNA的两倍，就说明提取的 RNA没有发生降解，纯度好。

RNA提取有其他多种方法，整个流程下来所用时间不同，如专门的试剂盒 Trizol可在 1.5 h内完成 RNA的提取工作，但得率较低，适合草本类植物；木本类植物用 CTAB法提取 RNA可在 1.5 d内完成，但得率高，此法可获得大量的 RNA用于 Northern杂交、基因克隆等工作。

(三) 提取的 DNA (RNA)的浓度检测

1. 取少量待测 DNA (RNA)样品，用 TE或蒸馏水稀释 50倍 (或 100倍)。

2. 用 TE或蒸馏水做空白，在 260 nm、280 nm、310 nm处调节紫外分光光度计的读数至零。

3. 加入待测 DNA (RNA)样品在上述 3个波长处读取 OD值。

4. 纯 DNA样品的 OD_{260}/OD_{280}大约为 1.8，高于 1.8可能有 RNA污染，低于 1.8有蛋白质污染；纯 RNA样品的 OD_{260}/OD_{280}大约为 2.0。

5. 根据 OD值计算 DNA (RNA)浓度或纯度。

$[SSDNA] = 33 \times (OD_{260} - OD_{310}) \times$稀释倍数

$[dSDNA] = 50 \times (OD_{260} - OD_{310}) \times$稀释倍数

$[SSRNA] = 40 \times (OD_{260} - OD_{310}) \times$稀释倍数

三、作业思考题

1. 提取 DNA、RNA之前为什么要先进行高压灭菌？

2. 提取 DNA、RNA的步骤主要有哪些？需要注意哪些问题？

3. 如何检测、评价提取的 DNA、RNA的质量？

4. 如何确定提取的 DNA、RNA的浓度？

(陈晓流)

实验 47　植物 RAPD 分析技术

RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA) 意为随机扩增多态性 DNA，是利用 PCR 技术进行随机扩增，把扩增的 DNA 片段进行琼脂糖凝胶电泳，根据 DNA 条带的多态性来反映模板 DNA 序列上的多态性。RAPD 同 AFLP、SSR 等分子标记一样都基于 PCR 扩增，只是 RAPD 分析只需要一个引物，其引物长度一般为 10 个核甘酸，其序列是随机的，不同核甘酸序列的引物均有商品出售。

单引物扩增是通过一个引物在两条 DNA 互补链上的随机配对来完成。基因组 DNA 的差异使引物与模板的结合位点及这些位点之间的距离不同，使 PCR 扩增后的片段大小表现出多态性。在基因组 DNA 分子内可能存在或长或短被间隔开的颠倒重复序列，如果这些序列与引物能碱基配对，则在两条单链上就会出现该引物的结合位点，结合位点的数量取决于这种重复序列的多少。不同 DNA 分子中这种颠倒重复序列间隔的长短不同，扩增条带的大小就不同，即表现出多态性。

10 碱基引物理论上有 4^{10} 种组合，不同引物检测的模板序列不同，用足够多的引物可覆盖基因组全序列，检测位点多，可以在完全不知道分子生物学背景的情况下对基因组进行分析，是研究植物系谱关系、起源与进化、遗传多样性及分子标记辅助育种的简单易行的方法；此外，外源基因转化后，转基因植株与非转基因植株相比，外源基因插入的部位导致基因组 DNA 序列不同或重排，当引物适宜时，扩增条带的长短就会不同，RAPD 技术可以检测出对照植株和转化植株 PCR 产物带型的区别。

由于随机引物短，与模板结合的退火温度低，易出现碱基错配，因此在实验中要严格操作程序及条件，使 RAPD 分析的结果较为稳定。因 RAPD 技术费用较低，方便易行，模板 DNA 用量少，不需要同位素，安全性好，继 RFLP 之后得到广泛应用；且操作上比 AFLP、SSR 等分子标记较为简便易行，因此，多数种类的栽培植物在资源多样性、分子标记等方面都有大量 RAPD 的研究报道。

本实验目的是学习 RAPD 技术的原理，掌握 RAPD 的操作及分析方法。

一、试材及用具

1. 试材

植物基因组 DNA。

2. 用具

PCR 仪、1μL，10μL，20μL，100μL 微量移液器及吸管、PCR 管 (200 μL 或 500 μL) 及管架、1.5 mL 离心管及管架、离心机、记号笔、磁力搅拌器、高压灭菌锅、电泳仪、电泳槽、电炉、三角瓶、紫外透射仪及凝胶成像系统。

3. 试剂

(1) 10 核苷随机引物。

(2) dNTP。

(3) 琼脂糖。

(4) 耐热 DNA聚合酶 (TaqDNA聚合酶)

与酶一起的还有两种药品,分别是

① 10× PCR Buffer

500 mmol/L KCl, pH 9.0的 100 mmol/L Tris-HCl, 1.0% Triton X-100。

② 25 mmol/L $MgCl_2$。

(5) 10 mg/mL的溴化乙锭 (EB)贮存液

在 100 mL蒸馏水中加入 1 g EB,在磁力搅拌器上搅拌数小时,使其完全溶解,转至棕色瓶中避光 4 ℃保存。EB是强诱变剂,称量时要戴手套和口罩。一旦接触了 EB,立即用大量水冲洗。

(6) 1× TAE电泳缓冲液

50× TAE浓缩贮存液含 Tris碱 242 g冰醋酸 57.1 mL, pH 8.0的 0.5 mol/L EDTA 100 mL,加 600 mL蒸馏水,在磁力搅拌器上搅拌,最后加蒸馏水定容至 1 000 mL。

(7) 6×凝胶加样缓冲液

0.25%溴酚蓝, 0.25%二甲苯青 FF, 40% (m/V)蔗糖水溶液, 4 ℃保存。

二、方法步骤

(一) 高压灭菌

把所用的吸头、PCR管、离心管等用具在高压灭菌锅中 121 ℃ (约 1.1 kg/cm^2)高压灭菌 30 min。

(二) PCR反应物的混合

所用反应体系为:25 μL反应体系中, 10× PCR Buffer 2.5 μL, 2.0 mmol/L $MgCl_2$, 0.2 mmol/L dNTP,各引物 0.1 μmol/L, TaqDNA 酶 1.5 U,各品种 DNA模板浓度为 20～50 ng,加重蒸水 (dd H_2O)补充到 25 μL。

按照该反应体系,先在 1.5 mL离心管中冰浴混合除模板以外的各成分,充分混匀,稍离心,分装到各 PCR管中,然后把各品种的 DNA模板分别加入到各管中,盖严管盖,在管外壁上做好标记,稍离心,放入 PCR仪中。

(三) PCR扩增

1. PCR反应

PCR反应在 DNA扩增仪中进行,所用程序为, 94 ℃预变性 4 min, 94 ℃变性 30 s, 36 ℃退火 30 s, 72 ℃ 2 min, 44个循环后 72 ℃延伸 10 min。反应结束后,取出管子,置 4 ℃冰箱中保存。

2. 注意问题

在进行大量扩增前需对该物种确定扩增的优化体系,尤其是没有文献报道过的植物种类,如 Mg^{2+}适宜的浓度, TaqDNA酶的用量,退火温度等,各因子设计出梯度,通过检测扩增带的稳定性和亮度来确定优化的反应体系。

(四) 琼脂糖电泳检测扩增产物

1. 制胶

根据 PCR反应管的数量和电泳槽的大小估算琼脂糖胶的体积,称 1.6% ～2.0%的琼脂糖溶解于 1×TAE电泳缓冲液中,在电炉上加热使琼脂糖充分溶解,待溶液温度降到 60 ℃,加入 EB,

使 EB的终质量浓度为 1 μg/mL,摇匀,倒入带有梳子的胶床中,避免产生气泡,室温下约 30 min胶自然凝固。

2. 点样

取出扩增 DNA的管子,取 7 μL扩增产物与 2 μL加样缓冲液混合;轻轻拔出琼脂糖胶上的梳子,把琼脂糖胶放入电泳槽中,倒入 1× TAE电泳缓冲液使液面高出胶面约 1 cm;移液器插上 10 μL吸管吸入 DNA样品后,尖端插入加样孔底部,缓慢把 DNA样品加入到加样孔中。

3. 电泳

加样完毕后,正确连接电泳槽和电源,黑线连阴极,红线连阳极,打开电源,正确设定电压及时间,时间的选择取决于胶的长度和电压大小。一般用不高于 5 V/cm的电压,电泳约 2 h,待溴酚蓝离胶边约 1～1.5 cm时停止电泳。

4. 检测和照相

小心取出凝胶,置于紫外透射仪上,紫外灯下检测扩增片段的有无及分离情况,在凝胶成像仪上照相,图片保存于计算机中,待统计分析。

5. 注意问题

(1) 两电极间电压不应超过 5 V/cm,电压越高,迁移越快,但分离效果相对较差。

(2) 扩增带如果不是细亮清晰而呈形状模糊或条带粗或相连,可能是 DNA加样量太多或电压过高或琼脂糖浓度偏低等,在重新电泳时应做适当的调整。

(五) RAPD条带分析

1. 条带分析

把 RAPD每个反应重复两次。以两次重复中稳定出现的亮带作为统计对象,有电泳带记为 1,无电泳带记为 0,录入计算机 Excel表格中。利用 STATISTIC软件,采用 UPGMA方法 (非加权类平均法:Unweighted Pair Group Method using Arithmetic Averages)对所用品种或材料进行聚类分析。S为两样品间的遗传相似度,D为遗传距离,$S=2N_{XY}/(N_X+N_Y)$,$D=1-S$,N_{XY}为两个样品共有的 RAPD标记数,N_X、N_Y 分别为 X样品和 Y样品分别具有的 RAPD标记数。

2. 注意问题

对电泳结果的判读同 PCR条件是否优化及引物数量是否足够等一样,会影响 RAPD结果的可信度。对电泳结果的判读主要是一些弱带的取舍问题,弱带取舍主要看其重复出现的几率,可进行重复实验;也可在难取舍的弱带位置上出现的电泳条带都不统计,这样可能丢失了一些多态性信息位点,对研究材料的系谱关系等影响不大,但当研究分子标记或构建基因连锁图谱时就不可取。

三、作业思考题

1. RAPD分析的基本原理是什么?主要有哪些应用?

2. 对于一种植物材料,进行 RAPD分析的主要步骤有哪些?

(陈晓流)

实验 48 植物 AFLP分析技术

AFLP(amplified fragment length polymorphism)意为扩增的限制性内切酶片段长度多态性,是通过限制性内切酶片段的长度不同检测 DNA多态性的一种分子标记技术。植物基因组 DNA经限制性内切酶双酶切后,形成相对分子质量大小不等的随机限制性片段,这些片段与人工接头连接形成带接头的特异片段,作为 PCR扩增的模板。通过 PCR反应来扩增酶切片段,把扩增的酶切片段通过变性的聚丙烯酰胺凝胶电泳来检测多态性 (即扩增片段的长度和数量的差异)。AFLP的基本反应程序主要包括模板 DNA制备,酶切片段扩增及凝胶电泳分析 3个步骤。

(一) 模板 DNA制备

先制备高相对分子质量基因组 DNA,纯度要高,避免降解。然后用两种限制性内切酶酶切,通常一种酶的识别位点是 6个碱基如 EcoRⅠ,另一种是 4个碱基如 MSeⅠ。用这两种内切酶共同酶切可产生较小的酶切片段,酶切一定要彻底。酶切完成后,加热令限制性内切酶失活,再把酶切片段连接到特定的接头 (adapter)上,形成扩增反应的模板。接头是一种人工合成的双链 DNA,长度一般为 14～18 bp,由核心序列和内切酶位点特异序列两部分组成。EcoRⅠ酶切结果可靠,价格便宜,MSeⅠ酶切产生较小且稳定的酶切片段,在 AFLP试剂盒中就用了 EcoRⅠ接头和 MSeⅠ接头。这两种接头核苷酸顺序为:

EcoRⅠ接头	MSeⅠ接头
5′-CTCGTAGACTGCGTACC	5′-GACG TGAGTCCTGAG
CTGACGCATGGTTAA－5′	TACTCAGGACTC-5′

(二) 酶切片段的扩增 (PCR)

1. 扩增反应的模板

酶切片段连接的接头及相邻的酶切位点的核酸顺序成为以后 PCR扩增时引物结合的位点。AFLP引物在 3′末端有 1～3个选择性核苷酸,酶切片段结合位点中能够与引物上的选择性核苷酸配对的,就被识别并用作模板,被选择性地扩增出来。

2. 扩增反应的引物

AFLP引物是一种人工合成的单链寡核苷酸,长度一般为 18～20 bp,由核心顺序 (CORE)、内切酶位点特异顺序 (ENZ)和选择性核苷酸顺序 (EXT)3部分组成。下面是 EcoRⅠ引物和 MSeⅠ引物各部分的组成,N代表 4个核苷酸中的任意 1个。

	CORE	ENZ	EXT
EcoRⅠ引物	5′-GACTGCGTACC	AATTC	NNN-3′
MSeⅠ引物	5′-GATGAGTCCTGAG	TAA	NNN-3′

在 AFLP引物中,3′末端上选择性核苷酸数目的多少决定了 AFLP扩增产物的多少,植物上一般含有 2或 3个选择性核苷酸顺序,用 +2或 +3表示。可根据基因组 DNA的大小确定引物末端所需的选择性核苷酸数目,如 2+2或 2+3或 3+3,使每个泳道中的扩增条带的数目在 50个左右,可在 20～100间波动,通过 PCR反应扩增这些酶切片段,产物主要在 1 kb以下,范围大约是 100～1 100 bp,作为 AFLP的扩增模板。

一般大于 10^8 bp的基因组 DNA可用 3+3引物组合，10^5 ～10^8 bp的基因组 DNA可用 2+3引物组合。在 AFLP试剂盒 kitⅠ内，EcoRⅠ和 MSeⅠ+3的引物，有 8种 EcoRⅠ引物和 8种 MSeⅠ引物，可组成 64种扩增组合。对于不同的植物基因组 DNA来说，不同的引物组合扩增的效果不同，需筛选适宜的引物组合。拟南芥、水稻、洋葱等使用了 2+3的引物组合，在使用 3+3引物组合中，以玉米和番茄为例，AFLP选择性扩增所用引物组合见表 6-1。由于 $(AT)_n$ 在高等植物中重复频率较高，公司对高等植物所推荐的选择性引物中多以 A、T碱基为主。随着 AFLP的应用，会有更多的接头和引物被商品化出售。

表 6-1 玉米、番茄 AFLP选择性扩增所用引物组合参考表

	M-CAA	M-CAC	M-CAG	M-CAT	M-CTA	M-CTC	M-CTG	M-CTT
E-AAC	番茄	番茄	番茄、玉米	番茄	番茄、玉米	番茄、玉米	番茄、玉米	番茄、玉米
E-AAG	番茄、玉米	番茄	番茄	玉米	番茄	番茄		
E-ACA	番茄	番茄、玉米	番茄	番茄、玉米	番茄、玉米	玉米	番茄、玉米	番茄、玉米
E-ACC	番茄	番茄	番茄	番茄	番茄	番茄	番茄	番茄
E-ACG	玉米	番茄	番茄	番茄				
E-ACT	番茄、玉米	番茄	玉米	番茄、玉米	番茄、玉米	番茄、玉米	番茄	番茄
E-AGC	番茄	玉米	番茄、玉米				番茄、玉米	番茄
E-AGG	番茄	玉米	番茄、玉米		玉米		番茄、玉米	番茄

3. 扩增反应的条件

酶切片段需经过两次 PCR扩增，使扩增结果更清楚，重复性好。第一次扩增称为预扩增（preamplification），所用引物只含有 1个选择性核苷酸，结果是大量扩增产物在凝胶中形成连续的一片，PCR所用程序为，94℃预变性 4 min，94℃ 30 s，56℃ 60 s，72℃ 60 s，20～30个循环后 72℃延伸 5 min。预扩增反应产物稀释后用做第二次扩增反应（选择性扩增，selective amplification）的模板，此次扩增中所用引物中的选择性核苷酸数目的多少是决定扩增产物多少的主要因素，而选择性核苷酸中 G和 C的含量对扩增产物数目也有很大影响，G和 C的含量越高，扩增产物数目越少。

选择性扩增反应采用递降温度梯度 PCR（touch down PCR），PCR开始于高温复性（一般为 65℃），以后复性温度逐渐降低，一直降到复性效果最佳的温度（一般为 56℃），然后保持在这个温度下，完成其余的 PCR循环周期。

（三）扩增产物的凝胶电泳分析

选择性扩增结果一般不用琼脂糖凝胶电泳检测，因为琼脂糖凝胶上几个到几十个碱基的 DNA片段分离不开。而 AFLP扩增的是酶切片段，这些片段有些相差不大，可能从几个到几十个碱基，一般用 5% ～6%的变性聚丙烯酰胺凝胶电泳可非常有效地分离扩增片段，形成 DNA指纹，经过银染后可进行观察、拍照和分析。

总之，AFLP需要极少量的 DNA材料，不需预先知道 DNA的序列信息，实验结果可靠且稳定，可用于分子标记、基因定位和作图、连锁图谱的建立等研究。本实验介绍 AFLP分析技术的原理、方法、操作及结果分析。

一、试材及用具

1. 试材

高质量的基因组 DNA。

2. 用具

PCR仪、1 μL、10 μL、20 μL、100 μL微量移液器及吸管、PCR管 (200 μL或 500 μL)及管架、1.5 mL离心管及管架、离心机、记号笔、冰箱、托盘、磁力搅拌器、高压灭菌锅、电泳仪、垂直电泳槽、电炉、三角瓶、紫外透射仪及凝胶成像系统。

3. 试剂

(1) 引物。

(2) dNTP。

(3) 琼脂糖。

(4) TaqDNA聚合酶。

(5) 内切酶 (EcoRⅠ和 MseⅠ)。

(6) 5× TBE buffer 1 000 mL

Tris碱 54 g, 27.5 g硼酸, 20 mL pH 8.0的 0.5 mol/L EDTA。

(7) 40%丙烯酰胺贮存液

称取丙烯酰胺 38 g, 2 g N, N′—亚甲基双丙烯酰胺,加蒸馏水至 100 mL,室温避光保存。丙烯酰胺具强烈的神经毒性,可经皮肤吸收,称量时要戴手套和面具,一般聚合后的聚丙烯酰胺无毒,但考虑到其中可能有少量没聚合的丙烯酰胺,仍需小心处理。

(8) 10%过硫酸铵

0.4 g过硫酸铵加 4 mL蒸馏水,在 4 ℃可保存数周。

(9) 6×凝胶加样缓冲液

见实验 47。

(10) TEMED (N, N, N′, N′—四甲基乙二胺)

液体,使丙烯酰胺单体聚合成长链。

(11) 固定 /终止液

冰醋酸 150 mL,蒸馏水 1350 mL。

(12) 显影液 (使用前 5 h配制)

2 L蒸馏水中加入 60 g Na_2CO_3,冷却至 4 ℃。使用前 5 min加入 37%甲醛 3 mL, 10 mg/mL $Na_2S_2O_3$ 400 μL。

(13) 染色液 (使用前 10 min配制)

2 L水中加入 2 g $AgNO_3$和 37%甲醛 3 mL,混合后即可使用。

二、方法步骤

(一) AFLP体系

1. 基因组 DNA酶切

酶切、连接反应按照公司出售的 AFLP试剂盒说明来进行,如在 0.5 mL微量离心管中加入:

template DNA (200 ng/μL)	1.0 μL
5×Buffer	2.5 μL
EcoRⅠ /MSeⅠ (1.25 U/μL)	1.0 μL
ddH_2O	8.0 μL
Total volume	12.5 μL

充分混匀，37℃温浴过夜。酶切后的 DNA样品置于 70℃保温 15 min，以灭活酶，然后置于冰上迅速冷却。

2. 人工接头的连接

酶切反应液	12.5 μL
adapter ligation solution	12.0 μL
T_4 DNA ligase (1U/μL)	0.5 μL
Total volume	25 μL

充分混匀，20℃保温 6 h。

3. 预扩增

用 0.1× TE将连接产物稀释 10～50倍 (具体的稀释倍数因物种不同及基因组 DNA浓度不同来确定，可设一些倍数的梯度来实验，确定适宜的稀释倍数)，作为预扩增的模板。预扩增体系为：

template DNA	5.0 μL
10×PCR Buffer	2.0 μL
$MgCl_2$ (25 mmol/L)	1.2 μL
dNTP (2.5 mmol/L)	1.6 μL
primerE+O (50 ng/μL)	0.6 μL
primerM+C (50 ng/μL)	0.6 μL
Taq DNA polymerase (5 U/μL)	0.2 μL
ddH_2O	8.8 μL
Total volume	20 μL

混匀后在 PTC－100型热循环仪上按如下 PCR条件扩增：

Step1	94℃	2 min
Step2	94℃	30 s
Step3	56℃	30 s
Step4	72℃	60 s
Step5	72℃	5 min

33～35个循环

预扩增结束后取 5 μL预扩增产物在 1.5%琼脂糖凝胶电泳中检测结果。然后，取 5 μL预扩增产物加 95 μL 0.1× TE作为选择性扩增的模板。

4. 选择性扩增

采用的反应体系为：

template DNA	2.0 μL
10×PCR Buffer	2.5 μL
$MgCl_2$ (25 mmol/L)	2.0 μL
dNTP (2.5 mmol/L)	2.0 μL
EcoR Ⅰ primer (50 ng/μL)	1.0 μL
MSe Ⅰ primer (50 ng/μL)	1.0 μL
Taq DNA polymerase (5 U/μL)	0.25 μL
ddH_2O	14.25 μL
Total volume	25 μL

将反应液混匀后，按如下 PCR程序扩增：

Step1	94 ℃		min	
Step2	94 ℃		30 s	
Step3	65 ℃每循环降低 0.7 ℃		56 ℃ 30 s	12个循环
Step4	72 ℃		0 s	
Step5	94 ℃		30 s	
Step6	56 ℃		30 s	23个循环
Step7	72 ℃		60 s	
Step8	72 ℃		5 min	

（二）AFLP结果检测（变性聚丙烯酰胺凝胶电泳）

1. 凝胶的制备及电泳

⑴ 玻璃板处理

用去污剂和清水将玻璃板洗涤干净，并用去离子水冲洗，最后用 95%乙醇擦拭、干燥；取 0.4 mm的边条，置于左右两侧，将短板压于其上，用夹子固定，插好梳子，准备灌胶。

⑵ 制备凝胶

配置 100 mL 6%的变性聚丙烯酰胺凝胶：加入 40%丙烯酰胺 15 mL，尿素 42 g，5× TBE 20.0 mL，10%过硫酸铵 0.45 mL，0.1 mLTEMED，用蒸馏水定容到 100 mL，充分混匀。

⑶ 灌胶

用注射器吸取上述溶液，排除针管内的空气，将注射器嘴插入两块玻璃板的空隙处，把溶液注入其中，避免产生气泡。把玻璃板斜靠在试管架上，可减少泄露和凝胶的变形。立即插入梳子，避免梳齿下产生气泡。让丙烯酰胺于室温下聚合 1 h。聚合好的凝胶可在使用前贮放 1～2 d，需用 1× TBE浸湿的纸巾包住梳子及凝胶顶端，再用保鲜膜包好，贮于 4℃。

⑷ 预电泳

胶聚合以后，将玻璃板安装在电泳仪上，电泳槽中加入足量的 1× TBE缓冲液。小心移去梳子，用蒸馏水清洗加样孔，80 W恒功率预电泳 30 min，以去除气泡。

⑸ 点样

把 DNA样品与适量 6×凝胶加样缓冲液混合，95℃变性 5 min，立即置于冰上冷却待用，每

个加样孔加 3～5 μL样品 DNA。

⑹ 电泳

70 W 恒功率电泳,溴酚蓝至胶的 3/4处时,终止电泳。

2. 银染检测

⑴ 固定 (脱色)

在托盘 1中加入 1.5 L固定 (终止液,将有胶的玻璃板放入托盘中,轻摇直到胶全部脱色;也可将胶在溶液中浸泡过夜 (不摇动)。将溶液回收待用。

⑵ 洗胶

在托盘 2中用 1.5 L蒸馏水洗凝胶 3次,每次 3 min。在将玻板取出时,让玻板竖直滴干水 10～20 s。

⑶ 染色

在托盘 3内加入 1.5 L染色液,将胶板放入托盘中轻摇 30 min。

⑷ 洗胶

将胶浸入托盘 2中,快速摇晃数秒,拿出,滴干水,立即将胶置于配制好的显色液中。注意,从将胶置于水中到将其放入显色液中,时间不超过 5～10 s。

⑸ 显影

轻摇显色液,直至胶上所有的条带都出现。

⑹ 定影 (终止显色)

将回收的固定 (终止液倒入显色液中,反应 2～3 min。

⑺ 洗胶

将胶板用蒸馏水洗 2次,每次 2 min。

⑻ 干胶

室温下自然干燥。

3. 条带观察和记录

把胶板拍照,也可干燥后永久保存。

(三) 数据处理

通过观察扩增结果,可以选出各种植物材料多态性较高的引物组合,确定分离群体某些基因的分子标记,计算试材间的遗传相似系数,进行聚类分析以研究亲缘关系等。具体方法为:采用 Mapmaker/Exp3.0软件对分子标记与目标性状进行连锁分析并绘制连锁群,利用 Kosambi函数将重组率转化为遗传距离 (Centimorgan, cM)。遗传相似系数 (genetic similarity, GS)按公式 GS = m/(m + n) 计算,m表示基因型间共有带数目,n表示基因型间差异带数目。遗传距离 (genetic distance, GD)为:GD = 1 - GS。聚类分析按 UPGMA方法。

三、作业思考题

1. 什么是 AFLP? 原理是什么?
2. 检测 AFLP扩增结果为什么用变性聚丙烯酰胺凝胶电泳?
3. 对给定的植物材料,进行 AFLP分析的主要步骤有哪些?

(陈晓流)

实验 49 植物 SSR 分析技术

SSR (simple sequence repeat, SSRs)称为简单重复顺序即微卫星 DNA 标记,是以 1～6个 bp 为重复单位,最常见的是 1～4个 bp,以串联形式重复 10～60次,它们普遍存在和随机分布于大多数真核生物的基因组中,重复的数量呈现高频率的变异,在高等植物 DNA 中大约 50 kb 中就有一个微卫星存在,如小麦上出现了 $(AG)_n$, $(AC)_n$, $(TCT)_n$, $(TTG)_n$ 等,每 212 kb 含有一个 $(AG)_n$,每 292 kb 含有一个 $(AC)_n$,三核苷酸重复 $(TCT)_n$, $(TTG)_n$ 大约是二核苷酸 $(AG)_n$, $(AC)_n$ 重复的 1/10。基序重复数的不同就形成了 SSR 座位的长度多态性。SSR 形成原因是,微卫星在高等植物中一般位于基因组的非编码区,其位点上的碱基错配和突变极少影响生物个体的生存和繁殖力,基序越长变异也越丰富,SSR 的多态性主要依赖于基序重复次数的变异。

在微卫星两侧一般是相对保守的单拷贝序列,检测 SSR 标记的关键在于设计一对特异的 PCR 引物。获得引物的途径有:从数据库或已发表的相关文献中查寻,使用亲缘关系比较接近的其他物种的引物,根据微卫星两侧保守的单拷贝序列寻找特异保守区而自行设计。目前,在大豆、玉米、小麦、水稻、葡萄、苹果、桃、甜樱桃、云杉、杨树及栎树等许多物种上从基因组文库和数据库中获得了 SSR 引物序列。一般的引物长度为 18～30 bp,扩增产物即 SSR 的多态性片段长度为 80～300 bp。

SSR 标记以 PCR 为基础,位点多态性高,操作简便,在植物遗传作图、种质资源保存利用评价、系谱分析、基因定位和分子辅助育种等方面得到广泛应用。

AFLP 标记与 SSR 标记的比较:AFLP 多态性检测效率高,其多态性是酶切片段 DNA 序列的变异,用少量引物组合能检测到大量的多态性位点,这些位点可能随机分布于多条染色体上,能覆盖整个基因组,但不能获得相关位点在遗传图谱上的位置信息;方法复杂,成本高。而 SSR 分析需要用多对引物分别做 PCR,多态性检测效率不如 AFLP 高,但 SSR 的多态性信息量高,即可在多个等位基因间显示差异,因为 SSR 两侧的保守顺序在等位基因间多相同,是位点特异的分子标记,这些位点固定于基因组中的某些染色体上,例如在小麦上仅用位于 D 染色体组上的 SSR 引物分析小麦品种的遗传多样性,就能够将全部参试品种区分开来;而且,其中 1D 和 4D 染色体上的遗传多样性最小,2D 染色体上的遗传多样性最高。大部分 SSR 位点在基因组中已定位到染色体上,而 AFLP 标记尚未定位,如果能进一步将 AFLP 位点定位于 SSR 连锁图上,将有助于 AFLP 的更为广泛的应用。

本实验介绍 SSR 分析技术的原理和操作等方法步骤。

一、试材及用具

试材、药品、试剂、用具等与 AFLP 分析所需的基本相同,参见实验 48,只是不再需要内切酶。根据实验植物的类型,首先需要从相关文献中查出该种植物或与其近缘的种类已经发表的 SSR 引物的核苷酸序列。选择其中的一部分,让商业公司按照序列来合成引物,如果这部分引物扩增条带的多态性不好,还需要再选择合成其他序列的引物,以选出扩增条带多态性高的引物作为该物种的 SSR 引物。

二、方法步骤

（一）建立 SSR反应体系

把设计好的引物加入 1 mL ddH_2O，计算出引物的浓度，由一对引物的核苷酸序列可以确定该对引物的退火温度（公司在提供引物的同时，也提示给用户每种引物的退火温度）。PCR体系中加入的各成分的体积数会因模板 DNA的浓度和引物浓度的不同而不同，一般在 25 μL体系中，模板为 50 ng，引物终浓度为 0.2～0.4 μmol/L。不同的试材还需要建立最佳的反应体系。下面是一种反应体系的例子。

ddH_2O	9.65 μL
10×PCR Buffer	2.5 μL
$MgCl_2$（25 mmol/L）	2.0 μL
dNTP（2.5 mmol/L）	2.0 μL
引物 1（20 ng/μL）	3.3 μL
引物 2（20 ng/μL）	3.3 μL
Taq DNA polymerase（5 U/μL）	0.25 μL
template DNA（50 ng）	2.0 μL
Total volume	25 μL

（二）PCR反应程序

94 ℃预变性 4 min；再按 94 ℃ 1 min，退火（如 56 ℃）1 min，72 ℃ 2 min，33个循环，72 ℃延伸 5 min。4 ℃保存。注意，退火温度因不同的引物组合而不同，在用不同的引物组合进行扩增时，都要根据该引物组合来设定反应程序的最佳退火温度。

（三）扩增产物的检测、照相

SSR扩增产物检测、照相方法同 AFLP一样，需要跑 5%～6%变性聚丙烯酰胺凝胶电泳，具体操作方法同 AFLP分析一样，见实验 48。考虑到做变性聚丙烯酰胺凝胶的复杂性，可以首先在 3%～4%琼脂糖凝胶上检测扩增产物的有无，如果有扩增带且大小不易区分，再跑变性聚丙烯酰胺凝胶电泳以区分扩增带的大小。

（四）数据处理与分析

数据记录、遗传相似系数分析和聚类分析的方法同 AFLP标记分析一样，见实验 48。

三、作业思考题

1. 什么是 SSR？原理是什么？
2. 如何检测 SSR扩增结果？
3. 对给定的植物材料，进行 SSR分析的主要步骤有哪些？
4. SSR标记和 AFLP标记有什么不同之处？

（陈晓流）

下篇　选择与利用变异

第七章　植物育种方案的设计、实施与选择技术

实验 50　植物育种计划的制定

植物育种的过程即是设计和实施育种方案的过程，而制定科学合理、可操作性强的育种计划是植物育种工作的关键性环节。在进行任何植物的育种工作之前，都要根据已定的育种任务和要求，结合本单位的具体条件，拟定出切实可行的育种计划。育种计划是育种工作的基本蓝图和具体实施指南，只有制定出合理可行的计划，整个育种工作才能方向明确，技术路线合理，措施得力，从而保证育种任务的圆满完成。育种计划的内容，应包括育种工作的全部过程和说明，即从育种目标和要求、田间设计和实施、选择和收获、世代间的连续和工作要点，直到新品种的育成和鉴定试验为止的所有过程，都要尽可能地具体一些，使育种工作能够按计划有条不紊地进行，而且也便于检查，可以保证育种任务的完成和育种目标的实现。

本实验使学生初步掌握制定植物育种计划的方法，从而对植物育种的基本过程有一个概括的了解和把握。

一、方法步骤

（一）设定育种计划的名称

育种计划的名称要简明扼要，并能表达出育种工作的基本任务和目标，如“优质耐旱小麦新品种的选育”。

（二）确定育种目标

育种目标是育种工作的依据，可以决定育种工作的成败。要在对当地条件、品种现状进行调查研究的基础上，根据当前国民经济和农业生产的实际，兼顾今后的发展，制定出科学合理的育种目标。育种目标的内容一定要具体，且有主有次，切忌泛泛一般化，要将育种目标落实到具体的性状指标上。

（三）选择种质资源

要根据育种目标，选择确定具有所要求的优异性状的种质资源。要明确种质资源的来源、表现特点、目标性状的遗传规律和不同资源间的亲缘关系。要注意尽量拓宽种质资源的遗传基础。

（四）选用育种途径

明确采用什么样的育种途径。首先根据不同繁殖方式植物的遗传特点，确定选育的品种类

型，然后再进一步选择适宜的育种方法。如选育自花授粉植物的纯系品种，可根据具体情况，选用品种间杂交育种，远缘杂交，回交育种，诱变育种等方法，或采用常规育种技术和生物技术等高新技术相结合的育种途径。在此基础上，再进一步确定具体的技术路线。以杂交育种为例，要选用恰当的亲本，配置合理的杂交组合，是单交还是复交，各个亲本杂交的先后次序也都要认真推敲、优化。

（五）试验的具体实施方案

1. 试验地的设计及材料种植

说明采用的育种途径，规划好种质资源材料区、杂种后代选择区、品系鉴定比较试验区等育种试验区。根据育种任务和不同性质材料的数量，规划好各区的面积、排列以及不同材料群体的规模。另外，确定不同世代材料的株距、行距、排列方式及播种方法。

2. 田间管理

写明试验地的地势、土壤类型和肥力。制定出具体的间苗、定苗、中耕除草、防治病虫害、水肥管理及其他相应的管理措施。

3. 田间观察记载及室内考种项目

根据育种任务和植物种类不同，以及人力的多少，其观察记载项目和考种项目也不同，但一定要抓住主要项目，重点突出。一般说来，要在植物生长的全生育期中，根据不同生育阶段和不同性状的表现特点，分期进行观察记载。如小麦育种，要分别在出苗期、越冬期、返青期、起身拔节期、抽穗期、灌浆期、成熟时等分期观察，要明确各个时期观察的性状和标准。另外，要特别注意在育种的主要目标性状表现最明显的时期进行重点调查记载。

4. 选择和收获

选择优良变异是育种的一个重要工作环节，也是育种者的一个基本功。要根据具体的育种目标、植物的繁殖方式、杂交方式以及性状的遗传特点等因素，制定出具体的选择方案。如在杂交时，要选择典型、无病、生长健壮的植株作为杂交亲本；杂种第一代（F_1）主要是评选组合，选择杂优大，性状互补好的 F_1 代组合收获；F_2 代重点是选择优良的个体；F_3 代以后主要以选株系为主。要制定出具体的选择时期、选择的性状标准、选株（或株系）的数量。要根据不同的育种要求和实际情况，确定收获的方法，如 F_1 代是以组合为单位混收，还是单株收获。另外，还要根据具体情况，采用不同的对杂种后代的处理方法，如系谱法、混合法、单籽传法等。

（六）特殊育种措施

说明为了实现育种目标和任务，需要采取的一些特殊的育种措施。例如抗病育种需要采用人工诱发鉴定时，说明采用的菌种、接种的时间和方法，是否需要特设鉴定圃。为了加快育种进程，可采用加代措施，说明是采用异地加代还是本地加代及加代的设施和技术方法等。

（七）编写育种计划书

在做好以上各步工作的基础上，编写出完整的植物育种计划书，以作为育种工作的指导。计划书的编写一定要经过广泛调研、充分讨论和论证。育种工作要以育种计划为依据，一般情况下，不要随意更改，经常变动，否则就失去了制定育种计划的意义，增加了育种工作的随意性和盲目性，或者反映出制定的育种计划质量不够高。另一方面，根据育种工作进展的实际情况以及条件等因素的变化，适时地对育种计划作适当的修改完善也是允许和必要的。关键是要处理好二者的关系并适度把握。

二、作业思考题

1. 以杂交育种为例，结合本校的研究课题，根据当地的具体情况，制定一份完整的育种计划书。

2. 制定植物育种计划有什么重要意义？应重点考虑哪些因素？

（胡延吉）

实验 51　植物育种试验田的规划与种植

育种工作从研究种质资源开始到新品种选育成功，是一个由各个工作环节组成的连续的过程，而育种试验田则是实现育种任务的最基本的条件和依托，育种试验田中各个试验区是不同育种环节的具体实施和体现。植物育种田间试验计划书的编制、田间规划和播种，是每年度不可缺少的基本工作，也是承上启下确保育种工作顺利连续进行的基础。由于育种程序年限长，环节多，内容繁杂，各个育种阶段的材料的特点及其在育种过程中的目的要求不同，相对于育种试验田各试验区的要求和规划也不尽相同。因此，植物育种试验田的规划和种植必须遵循一定的方法步骤和严格的操作规程，从而保证试验质量，使育种工作有计划地顺利进行，圆满地实现育种目标和任务。

本实验通过参加植物育种各试验区的播前准备和播种工作，使学生熟悉和掌握植物育种试验田各试验区的规划及播种的技术。

一、试材及用具

1. 试材

植物（小麦、玉米、棉花或其他作物）育种试验的播种材料。

2. 用具

木牌、皮尺、木尺、细绳、锤子、划行器及开沟锄等。

二、方法步骤

（一）编制田间试验计划书

编写田间试验计划书是落实植物育种计划的重要工作环节，有助于育种方案的具体实施，并且利于试验资料的归类存档。田间试验计划书应装订成册，并一式两份，一本存档，另一本用于田间试验的执行。田间试验计划书应妥善保存，严防丢失，以免造成难以弥补的损失。田间计划书通常包含的主要内容如下：

1. 试验计划的基本情况：包括试验名称、目的要求、试验地概况（地点、面积、地形、土质、肥力及前茬作物等）、各个试验区情况（试验区名称、试验区起止号、试验区面积、形状、排列方式及重复次数等）、走道的宽度、水渠的设置和保护行的设置等。

2. 绘制田间区划示意图（表 7－1，以小麦育种试验田为例）。

3. 试验材料田间种植计划表（表 7－2，表 7－3，表 7－4）。

（二）试验区规划

在田间区划时，根据地形走势确定各个试验区的位置。可先量出整个试验地一边的总长度，并在两端钉上木桩（或木牌）作为标记，拉上细绳并固定作为标定整个试验区的基本线。然后，以其中一个木桩为起点，沿试验地另一边拉一条与基本线垂直的线。应用“勾股”定理，用皮尺量出 3 m、4 m、5 m长的 3个线段做一直角三角形，把 3 m的一段放在基线上，4 m的一段放到试验田的总宽度上，用 5 m长的一段作斜边，这样长、宽两线就互相垂直了。采用同样的方法确定其他的直角，并把另一边的总长和总宽画出，这样就把整个试验田的位置定好了。

各试验区的分区和试验小区的划分是按试验设计进行的。在两条总长线上，按设计方案量出小区长、渠道和走道宽度并钉好木牌，就已把重复和走道划出。在总宽线上分别量出小区宽度，边量边插上木牌做好标记。用划行器在畦面上划行，即完成了田间区划工作。

（三）各试验区的种子准备

各试验区的种子准备因不同试验区而要求不同。以自花授粉作物小麦为例简要说明如下：

1. 原始材料区

种植从国内外搜集来的原始材料和杂交用的亲本。每个材料播种 2～3行。对每一材料挑选典型、饱满的种子，并数取或称取每行种子数量或质量装入一个纸袋内。纸袋上用铅笔写明材料名称、去年行号、粒数等，按顺序排在种子盒内，然后每隔 9袋或 19袋插入一袋标准品种，统一编行号，用回形针或橡皮筋将每 10或 20个种子袋夹在一起。

2. 选种圃

F_1 代按杂交组合顺序排列，依杂交所得种子多少，每一组合种 1～3行不等。在每个单交组合前插种父、母本各一行或在组合的两侧分别插种父母本。

F_2 代以杂交组合为单位排列种植。在单交组合前插种父、母本各一行，各杂交组合种植的行数因杂交方式、是否重点组合及其他因素而不相同。

F_3 代以及以后各代，播种上代当选的单株。每世代按组合顺序种植，排完一个组合，再排另一个组合。每个单株的后代种成一个株行，一般 3～4行区。

选种圃各世代材料，均按照相应播种规格要求数取或称量每行的种子，完成种子分装后，仍每隔 9袋或 19袋插入一袋标准品种，并统一编号，以备登记填写田间试验计划书。

（四）播种

种子播种前，还应预先做好木牌，在其上端用毛笔写上行号或区号，一般每隔 9或 19行写一木牌。用手工播种时，须按田间种植计划书，将已编好号的种子袋分发排列在相应各试验区的播种行内，并检查种子袋上的编号与行号或试验小区号是否一致。如无错误，即可开沟播种。开沟时要深浅一致，行长达到规定长度。播种后覆土、荡平，适当镇压。播完一行后，把种子袋放在该行的另一端，待收集空袋时，再查对一次纸袋编号与行号是否一致。如发现错播、漏播应及时记录在记载本上，以备在田间种植计划书上更正、注明。每一试验区最好在一天内播完，每一个重复必须在同一天播完。原始材料一般采用条播，选种圃采用单粒点播，高代材料也可以稀条播。最后在每畦两头播 3～5行保护行。

若为机播时，可根据情况，预先用种子盒分装种子，或预先调节播量，然后播种。要注意防止重播、漏播、并行、串行等。

三、作业思考题

1. 组织学生参加育种试验田的区划和播种工作，检查他们区划和播种的质量。实习结束后，根据操作情况，按表 7－1～7－4所列项目进行总结。

2. 种子准备和田间区划、播种时应注意哪些问题？

表 7－1　育种试验（小麦）田间规划图

水　沟																
品系繁殖保护区																
品系	←	杂	优	利	用	区	→	中	←←	F_1四—品	代畦—系	→—鉴	←—定	品比试—试	系较验—验	→→	品系
水　沟																
繁殖	←	原材	始料	→	←	F_2		间	代		十		一		畦	→	繁殖
水　沟																
保护	←	F_3	代	六	畦	→	←	走	F_4代	四畦	→	←	F_5	代以	上共	六畦	保护
水　沟																
区	→	←	中	间	材	料	→	道	←	性	状	遗	传	研	究	→	区
品系繁殖保护区																

表 7－2　原始材料和中间材料种植计划表

材料来源	材料名称	去年行号	今年行号	记载项目	备　注

表 7－3　选种圃种植计划表

去年行号 (含株号)	今年行号	种子来源 或杂交组合	去年鉴定 结果摘要	记载项目	备　　注

表 7－4　品系鉴定圃和品系比较圃种植计划表

品系名称 或代号	种子来源 或杂交组合	去年行号 或区号	今年区号 (年份 —区组号 —小区号)	记载项目

(胡延吉)

实验 52　植物育种程序观察

根据繁殖方式的不同,可将植物分为有性繁殖和无性繁殖两大类。在植物进行有性繁殖时,又可分为自花授粉、异花授粉和常异花授粉等类型。植物繁殖方式与采用的育种途径及相应的育种程序间有密切的关系。常规杂交育种和杂种优势利用均适用于有性繁殖植物。一般说来,品种间杂交育种是自花授粉和常异花授粉植物的主要育种途径之一,杂种优势利用是异花授粉植物品种选育的主要方式,而营养系杂交育种则适用于绝大多数果树、花木和球根类花卉,以及进行无性繁殖的蔬菜、大田和各种经济作物如甘薯、甘蔗、咖啡和三叶橡胶等。上述育种途径具有各自不同的工作环节和育种程序,现分别予以介绍,可根据具体情况,安排学生进行观察实习。

本实验使学生初步掌握不同繁殖方式的植物的基本育种程序,了解各个试验圃的田间设计和工作内容,学会相关的育种操作技术。

一、试材及用具

植物育种试验地、制种田、试验计划书及田间种植图等。

二、方法步骤

Ⅰ 自花授粉和常异花授粉植物杂交育种程序

杂交育种工作的全过程包括几个连续的选育阶段，并形成与之相应的工作程序和几个试验圃。现简介如下：

（一）原始材料圃和亲本圃

原始材料圃种植从国内外搜集来的原始材料，按类型归类种植。亲本圃种植从原始材料圃中选出的有可能作为亲本利用的材料以及在育种工作中积累的一些基本亲本材料。原始材料和亲本材料顺序排列，每一材料播种一个小区（2～5行），可点播或稀条播。其主要任务是对种植的材料进行鉴定、研究，选择亲本进行杂交。

（二）选种圃

种植杂种及其分离世代材料的地段称为选种圃，有时也将种植 F_1、F_2 的地段称为杂种圃。采用系谱法时，在选种圃内连续选单株，直到选出优良品系为止。

1. 杂种第一代（F_1）

按组合顺序排列，单粒点播，并相应播种亲本，每隔 9或 19行种一行对照品种。F_1 代性状整齐一致，一般不选株，只淘汰过差的组合和假杂种。一般按组合混收、脱粒。

2. 杂种第二代（F_2）或复交一代

按组合顺序播种，单粒点播。在各组合前种植亲本和在适当位置种对照品种。F_2 代是性状分离最大的世代。要按育种目标在优良组合内多选单株，一般组合内少选单株，淘汰组合内不选单株，所选单株单收、单脱。

3. 杂种第三代（F_3）

上代每个当选单株的种子播种一个小区（3～5行），单粒点播，成为一个株系。每隔一定行数均匀设置对照品种。F_3 代一般仍有分离，主要工作内容是选拔优良株系中的优良单株，按单株收获、脱粒、保存。

4. 杂种第四代（F_4）及以后世代

种植方法与第三代相同。来自同一 F_3 株系的 F_4 各株系（系统）称为株系群。F_4 主要工作是首先评选优良株系群，从中选拔优良株系，再从优良株系中选优良单株。从 F_4 开始，已出现为数不多的性状较为整齐一致的株系。对优良一致的株系可混收，改称为品系。

（三）品系鉴定圃

种植由选种圃入选的优良品系和上一年鉴定圃留级保留的材料。其任务是对各品系进行初步产量比较试验以及对性状的优劣作进一步的观察鉴定。一般采用顺序排列法。每隔 4或 9个小区设 1个对照小区。重复 2～3次或不设重复。一般每小区种植 3～6行，种植密度及田间管理接近大田生产条件。试验一般进行 1～2年。

（四）品种比较试验圃

种植鉴定圃升级或上年品种比较试验圃留级的品系。在较大面积上对其产量、品质及其他性状进行更为全面和严格的鉴定比较，从中最后确定一至几个优良品种（系）送交区域试验。品

种比较试验参试材料数目较少，通常 10～15个。采用随机区组设计，重复 4～6次，小区面积较大，如小麦小区面积为 20～40 m^2。试验地耕作、播种、管理等作业力求接近大田生产条件。各参试品种（系）一般均试验 2年以上。

Ⅱ 异花授粉植物杂种优势利用的育种程序

该类植物杂交种的选育大体可分为以下几方面内容（以玉米为例）：

（一）自交系的选育

1. 基本材料的种植与选株自交

品种、各类杂交种、人工创造和引进的材料和类型都可作为分离自交系的基本材料。将其分区种植在基本材料圃内，在基本材料抽雄后开花前选优良的基本株（S_0）套袋自交。用适宜大小的防水纸（如羊皮纸袋）分别套住雌雄花序，开花散粉前进行人工授粉自交。收获后再进行穗部观察，淘汰病穗劣穗。中选果穗分别脱粒、编号、保存。

2. S_1 的自交与选择

将上年每个自交株分别种成穗行（S_1）。S_1 代明显地出现性状分离和生活力严重衰退现象。在严格选择的基础上大量淘汰不符合育种目标要求的穗行，在优良穗行中继续选株自交。S_1 大约淘汰穗行数的 1/2～2/3。在每个中选穗行内选留 5～8个果穗自交。

3. S_2 的选择

上年选择的 S_1 自交果穗仍以果穗为单位相邻种植，生长出来的植株为 S_2 植株。同一基本株的不同 S_2 穗行，互为姊妹行。S_2 的性状仍在继续分离，生活力也仍在继续下降。要继续从优良穗行中选择优良植株套袋自交。每一中选穗行，一般初选自交果穗 8～10个，经过以后各个阶段的严格选择最后保留 3～5个果穗即可。

4. S_3 及以后各代的选择

基本与 S_2 代相同，在优良穗行中连续选择优株自交，直至性状稳定成为性状整齐一致的自交系为止。自交代数越高，选择标准越严格，每个穗行选择自交的果穗则越少（1～2个果穗即可）。

（二）自交系配合力测定

测定自交系配合力是组配强优势杂交种的必不可少的工作环节。测定自交系配合力的方法很多，通常采用以下方法：

1. 一父多母隔离区测定法

把各个被测系顺序种植在一个隔离区内，每隔一定行数种 1～2行共同测验种作父本（共同测验种一般选用一个遗传基础广泛的品种群体）。在被测自交系抽雄后开花前彻底去雄，用测验种的花粉给它们自然授粉，分别产生多个测交种。第二年通过测交种产量比较，可得出各个被测自交系的配合力。

2. 多系测交法

利用几个优良自交系或骨干系作测验种，与一系列被测系测交，又称骨干系法。将上述材料种于一个测交区内，根据计划，用各个骨干系分别与一系列被测系套袋杂交，组成一系列单交组合，下代进行测交种比较试验，可计算出每个被测系的一般配合力和各组合的特殊配合力。例如有 4个骨干系，100个被测系，则可获得 400个测交种。

（三）杂交组合的比较选择

根据杂交种组配的原则组配成的杂交种还必须进行一系列的田间比较试验，才能最后确定其优劣。玉米杂交种的鉴定比较，一般进行以下 3个步骤：

1. 初配组合鉴定

初配组合数量多，每个组合的种子少，因此小区面积较小，一般 1～2行，每行 20～30株，每隔 4或 9个小区设一对照区，重复 1～2次。从中选出少数优良组合升入初选组合比较试验。初配组合鉴定一般只进行 1年。

2. 初选杂交组合产量比较试验

参加试验的组合数一般不超过 20个。试验设计一般为 4～6行区，每行 20～40株，重复 2～4次。主要根据产量和综合性状的表现，从中选择 1～2个最好的杂交组合参加区域试验、生产试验和栽培试验。比较试验一般进行 2年。

3. 区域试验、生产试验和栽培试验

内容与要求与其他作物基本相同，不再叙述。

Ⅲ 营养系杂交育种程序

营养系杂交育种实质上是有性杂交和无性繁殖相结合的一种育种途径，既可以利用基因重组，又可以固定杂种优势。以甘薯为例，将其育种程序简介如下：

（一）甘薯诱导开花和杂交技术

参阅实验 4或其他相关实验指导书。

（二）实生苗的播种和管理

1. 种子处理及催芽

甘薯种子种皮坚韧，不易透气吸水，播前应进行种子处理，常用的处理方法是硫酸浸种。将种子按杂交组合分别放于发芽皿中，倒入浓硫酸少许以能没住种子和种子粘上硫酸为度。搅拌均匀，经 1 h左右，倒掉硫酸，反复用清水冲洗干净，然后进行 25℃定温催芽（约半天）。待种子膨胀或露现小芽尖时即可播种。

2. 种子播种与管理

种子要争取早播。可采用温室或苗床加盖薄膜的保温育苗方法。按组合分行单粒点播，行距 10～13 cm，株距 3～6 cm，播后覆盖疏松细碎营养土 1.5 cm，保持床温 25～30℃，经常保持床面湿润，促进苗芽早出快发。注意水、肥松土管理，防治虫害，拔除畸形苗、劣苗和杂草。待苗龄 5～6片真叶时，打顶尖去分枝，以利多剪苗。

（三）实生苗株（系）选择

实生苗株（系）（即营养系）选择是育种过程中的关键环节。将苗圃中实生苗按组合分类选苗栽插于春薯初选区。每行 10株，栽前剪去主根，按需要设亲本、对照区。于夏秋薯栽插时，从实生苗春薯初选区选株编号，剪秧栽插于夏秋薯株系选择区。每株各剪 5～10根栽插一行进行株系比较。收获时，以夏秋薯为主，参照春薯初选区进行选系、选株。

实生苗的选择，一般在春薯初选区栽植前、薯株栽插时和收获期分 3次进行。收获期选择是关键，着重调查入选株（系）主要性状、熟食品质、产量、烘干率、抗病性和结薯习性等。田间入选率一般在 5%以下。

（四）品系产量、适应性等鉴定试验

1. 鉴定区（圃）

针对供试材料的多少，分别采用顺序排列法或多次重复法。每区 3行，重复 2至 3次，小区面积 15 m^2 左右。全面鉴定特征、特性。根据育种目标，生育期间进行挖根调查，鉴定块根增长动态。另外，酌情进行抗逆性、抗病性、贮藏性、品质等有关性状的直接或综合鉴定。选出的品系进一步参加品种比较试验。

2. 品种比较及区域试验

与其他作物基本相同，不再细述。

三、作业思考题

1. 选择一种或几种不同繁殖方式植物的育种试验田，带领学生按不同育种阶段的试验区进行观察和学习。每个学生整理出实习报告，说明育种各个试验区的田间设计、种植方法和主要工作内容等。

2. 试比较不同繁殖方式的植物育种程序的特点。

（胡延吉）

实验 53 有性繁殖植物杂种后代选择

有性杂种于杂种二代（F_2）开始基因分离，对一些单基因或寡基因控制的质量性状的选择从 F_2 代就开始了，经过若干世代个体和群体鉴定、选择和淘汰，把分散在不同亲本上的优良基因集中到若干个个体或小群体内，把入选的优良个体或小群体加以繁殖，再经过一系列鉴定、选择和淘汰就育成了新的植物定型品种。在整个选育过程中，由于不同种类的植物的开花结果习性、繁殖方式、性状遗传特点和目标性状要求等不同，对杂种不同世代的人工控制授粉、留种方式、群体大小、选择指数、选择标准等也应该是不同的。由于采用的选择方法不同，对杂交后各个世代的处理方法差别较大。

实验目的是观察有性繁殖植物杂交后各世代的性状表现，学习对杂交后不同世代的处理技术，系统地了解系谱法选育方法的技术要点。

本实验以甘蓝为例来进行详细的说明。

一、试材及用具

1. 试材

有性繁殖植物的杂交种的各世代材料（F_1，F_2，F_3，…），自花授粉植物可选小麦、番茄、葡萄等，异花授粉植物可选玉米、大白菜及杏等，常异花授粉植物可选茄子、棉花等。

2. 用具

隔离纸袋、棉线、纸牌、镊子、放大镜、显微镜、竹牌、钢卷尺、70%酒精及铅笔等。

二、方法步骤

每实验组 3～5个人，按下列程序进行。

（一）准备种子

将亲代 (P)、F_1、F_2 以及以后各代的种子在实验室整理、编号、登记准备好。

（二）育苗

把上述种子分别在苗床中按组合、世代、株系播种在营养钵中进行育苗，分别按系统的编号插上标牌。注意苗期肥、水和病、虫害防治管理，也可直接播种于事先规划好的试验区。

（三）田间实验的规划设计

按各组合、世代、株系的种子量或育苗数规划好试验地即 F_1 代区、F_2 代区、F_3 代区等。

1. 杂种一代 (F_1)区

按杂交组合分别播种、栽植，两旁为父、母本。如果亲本为自花授粉作物或是自交系，一般以获得 F_2 代足够播种量为依据确定栽种株数，一般 5～10株；如果亲本是异花授粉作物或是品种，则栽种 30～60株。父、母本的栽种应按实验地的面积、小区设计等而定，一般栽种 5株左右。

2. 杂种二代 (F_2)区

按 F_1 组合和组合内株系编号分别播种、栽植，可按 $X=2.5\times4^n$ 这一公式去计算栽种株数，X为出现 1株纯合理想株应栽种的杂种二代株数，2.5为机率常数，n为控制目标性状的基因对数。这种计算对亲本遗传规律不清的试材是不能办到的，有时可用目标性状数代替基因对数 (n)，一般栽种 1 000～2 000株。每隔 10个小区设 1个标准品种为对照，栽种株数为 30株左右。

3. 杂种三代 (F_3)区

将 F_2 单株系 (系统)分别栽种 1个小区，每小区栽种 30～100株，每隔 5～10个小区设 1个标准品种对照区。

4. 杂种四代 (F_4)区

将 F_3 代选出的系统群、系统、系统内选出的株系分别栽种各自的小区，栽种株数为 30～100株，每隔 5～10个小区设 1个标准品种对照区，有时可设 2次重复。杂种四代以后的世代同杂种四代相似，可将小区面积适当增大些。

（四）杂种后代的选择及处理

这项工作应该安排在实验课后，利用课外时间进行。

1. 杂种一代 (F_1)

⑴ 自花授粉植物或自交系间异花授粉的 F_1 代，性状基本一致，除了淘汰不良组合外，一般不进行组合内株选，只在组合内淘汰伪杂种和性状表现特别差的植株，按组合留种。在性状观察记载方面，通常只记载性状显隐关系和杂种优势情况，不作详细记载。

⑵ 异花授粉植物或复合杂交，性状一般都会发生不同程度的分离，除了淘汰不良组合外，在入选组合内选择若干优良单株，人工控制自交，分株系留种。在观察记载方面，除了观察、记载重要性状显隐关系和杂种优势外，还应注意性状分离情况，有时还要进行一些分析、统计研究。

2. 杂种二代 (F_2)

F_2 是性状强烈分离的世代，同一组合内株间差异很大，会出现各种各样的性状。因此，先进

行组合间比较，淘汰一部分重要性状表现平均值低，又没有突出优良单株的组合，再在中选的组合中进行单株选择。选择时力求准确适当，选择标准不要过严，主要针对质量性状和遗传力高的性状（如抗病性、植株生长习性、成熟期、产品器官的形态和色泽等）进行单株选择，应多入选一些较优良的单株，通常优良组合的入选株数约占本组合群体总数的 5% ～10% 左右，次优组合的入选率可少些。当选单株挂上标牌作好标记，对异花授粉蔬菜要分株人工控制自交。成熟时按组合分株收获，分别脱粒，种子分株装袋，编号保存，下次按组合分株播种。

在观察、鉴定、记载方面，主要对重要经济性状进行观察、鉴定，调查其分离情况及变异幅度，并尽量使调查标准数量化，以便于统计分析。

3. 杂种三代（F_3）

无论自花授粉还是异花授粉的蔬菜作物，都是从 F_2 代选留下来的单株系。杂种三代的性状，一般仍有分离，有些可能多数性状符合要求，但仍有一些性状尚未达到目标。因此，F_3 代的选择，以单株选择为主，性状稳定下来的就进行株系比较选择。F_3 代是开始对产量等遗传力低的数量性状进行系统间（株系）比较选择的世代，从 F_3 代开始要重视系统间优劣的比较，按主要经济性状和整齐性选择优良系统，再在当选系统内针对仍在分离的性状选择单株。应多入选一些系统，每一系统入选株数可少些，为 6～10 株。如在 F_3 中发现有优良的、比较整齐一致的系统，对自花授粉作物（菜豆、豇豆）可在去劣后混合采种，下代升级鉴定，对异花授粉作物则在去劣后进行人工控制的系统内株间授粉，然后混合留种。

在观察、鉴定时，应主要注意系统间性状优劣的鉴定和系统内一致性的鉴定。

4. 杂种四代及以后各代

F_4 代首先比较系统群的优劣，从优良系统群中选择优良系统，再从优良系统中选择优良单株。此代的选择任务是株系选择和单株选择并用。对优良稳定的系统群去劣混合采种，下代升级鉴定。在优良稳定的系统群中各姐妹系如表现一致，可按系统群去劣混收，下代升级鉴定。F_4 升级鉴定的系统内如出现特别优良的单株可单选下一代播种成单系，继续选择提高。F_4 以后各代主要是进行系统间的比较和选择，选出优良一致的系统后混合留种，进行升级鉴定。F_4 以后表现性状仍不稳定的材料，需继续进行单株选择，直至选出整齐一致的系统。不过，杂种到了第四代，如果还没有优良单株分离出来，以后就不大可能出现好的单株，这样的组合和系统应该予以淘汰。

5. 讨论及执行

每小组按教师分配的具体任务，讨论杂种后代的选择和处理实施方案，经教师批准后，按批准方案执行。

三、作业思考题

1. 每人绘制 1份田间栽种平面图。

2. 每组制定 1份《杂种后代选择和处理实施方案》，包括性状鉴定，株选、系选标准，入选株的授粉处理和种子成熟后室内考种等。

3. 每人写 1份各代植株性状遗传变异观察报告。

4. 杂种后代选择的理论根据是什么？

5. 自花授粉植物和异花授粉植物的后代选择、鉴定和人工控制授粉方式有什么不同？提高

杂种后代选择效果的途径有哪些？

（孙丽萍）

实验 54　植物芽变选种技术

芽变是体细胞突变的一种，突变发生在芽的分生组织体细胞中，当芽萌发长成枝条时，在性状上表现出与原类型不同，即为芽变。芽变是遗传物质的突变，它的表现多种多样，极其复杂。因此，要开展芽变选种，提高芽变选种工作的水平。区别一个变异体是芽变还是彷徨变异（又称饰变）的最可靠方法是采用无性繁殖将变异体进行移植，然后将移植体与变异体和对照三者进行比较鉴定。但是由于无性系内的变异是极其普遍的，无论单株间、枝间还是果间都有差异，而这种差异的极大部分都属于彷徨变异，所以首先应当对变异体进行观察，通过分析变异性状与环境的相关关系，从而把其大量的显而易见的彷徨变异予以淘汰，只把个别突出的很可能与环境无直接关系的变异进行移植鉴定。

实验目的是了解怎样通过分析变异，区别芽变和彷徨变异，观察不同的植物所具有芽变的不同表现形式，了解芽变的细胞学和遗传学基础。

一、试材及用具

1. 试材

枝变或株变 1～3个。

2. 用具

片尺、皮尺及叶膜板或分格松。

二、方法步骤

芽变选种分二级进行。第一级是从生产园内选择初选优系，包括枝变、单株变异；第二级是对初选优系的无性繁殖后代的比较筛选，包括复选和决选两个阶段。

（一）调查访问

调查访问变异体的苗木来源、砧木种类、已否繁殖和繁殖以后的表现，变异性状在历年中有何突出的变化，施用过何种激素和有无采取过特殊的措施以及立地条件有何特殊。

（二）对变异体进行观察与分析

1. 对株变要注意和其他树株做对比分析，看是否存在连续性变异，同类变异是一株还是多株。

2. 对枝变要注意观察是一个枝还是几个枝，是否为嵌合体。

3. 对产量的变异要解析产量构成因素。

4. 对数量性状的变异要注意观察是否同时存在着品质性状的变异。

5. 注意有无劣变性状。

6. 分析变异有以下 5条依据：

⑴ 变异性状的性质

品质性状一般不会因环境条件的影响表现为饰变，所以只要是典型的品质性状发生改变，比

如果皮无色与有色、片红与条红、有毛与无毛、果实香味的有无、花粉育性的彻底改变等，一般即可判定这些变异是芽变。

⑵ 变异体的范围

变异体包括枝变、单株变及多株变 3种情况。如果是多株变异，立地条件不同，可排除环境的影响；砧木不同，可排除砧木的影响。如果是一个单株变异，则有 3种可能，或为芽变，或为饰变，或为实生变异。对于枝变，要观察它是否为嵌合体，如果变异是一个扇形嵌合体，即可肯定为芽变。

⑶ 变异的方向

凡是饰变都与环境条件的变化相一致，而芽变则常常看不出与环境条件有明显关系。

⑷ 变异性状的稳定性

饰变既然是一般环境因素在表型上的反映，只有当这一环境条件存在时，表型才能表现这种变异；条件不存在时，变异就会消失。所以，通过了解变异性状在历年的表现，结合分析其环境因素的变化，就能对变异作出正确的分析判断。

⑸ 变异性状的变异程度

环境条件造成的饰变，不会是漫无边际的，而应当是在某一基因型的反映规范之内，如果超出这一范围，就不可能是饰变。当然，这不能理解成饰变的变异程度总是小于芽变，而是既要从变异程度上进行比较，又要结合环境条件及其他性状全面分析，综合判断，才能得出正确的结论。

㈢ 复选

包括两部分工作，一方面是对变异的准确鉴定，即对经过观察与分析仍无法确定为芽变或饰变的变异，要在高接鉴定鉴定圃及选种圃继续进行鉴定；另一方面的工作就是对优良的芽变品系进行品种比较试验和区域性栽培试验。

㈣ 决选

通过初选以后，就要进行决选，参加决选的品系，应由选种单位提供下列完整材料和实物。

1. 该品系的选种历史、评价和发展前途的综合报告。

2. 该品系在选种圃及品种比较试验圃内连续不少于 3年的果树学与农业生物学的完整的鉴定数据。

3. 该品系在不同自然区内的生产试验结果和有关鉴定意见。

4. 该品系及对照的新鲜果实，数量 不少于 25 kg.

上述资料、数据和实物，经审查鉴定后，各方面确认某一品系在生产上有前途，可由选种单位予以命名，作为新品种向生产上推荐，在发表 新品种时，应提供该品种的详细说明书。

三、作业思考题

针对所观察的变异体的具体特点，确定观察项目并与对照进行对比观察，初步论断变异体是芽变还是彷徨变异，并提出处理意见。

（孙丽萍）

实验 55　无性繁殖植物杂种后代选择

无性繁殖植物杂交育种可通过有性杂交综合亲本的优良性状，用无性繁殖保持品种的同型杂合，同时利用亲本的加性和非加性遗传效应。无性繁殖植物的性状遗传特点，决定了其杂种后代的选择方法与有性繁殖植物的选择方法存在着差异。由于亲本在遗传上杂合程度大，无论哪一代杂种后代都会产生复杂多样的分离，这就决定了杂交育种一般都采取强度较大的一次单株选择法。有些无性繁殖的木本植物幼年期长，从播种到开花结果一般需要 3～10年以上，决定了选择必须分阶段进行早期选择。最后的优株以营养系进行后代鉴定。

无性繁殖植物杂种后代的选择程序是先使供选材料开花结籽，用这些种子种植一个实生选种圃，如果供选材料只是一个品种或是一个杂交组合则可以不分区。从实生选种圃内选择若干优良植株，分别收获它们的无性繁殖器官，编号成为一个无性株系。下一代（即营养系第一代）每一营养株系播种一小区进行比较鉴定，以后的工作程序和一次单株选择法相同。由于无性繁殖器官繁殖时无需隔离以防止杂交，也没有自交生活力退化问题，因而通常都是用单株选择法以提高效果，而不用混合选择法。用有性后代单株选择法选育新品种时，通常只进行一次有性繁殖，因为经过一代有性繁殖已能产生大量变异供选择，一般没有必要费工费时进行两次以上有性繁殖。另一方面，通过一次有性过程所产生的变异，如果符合要求就可以通过无性繁殖在后代固定下来，无需进行自交纯化。

实验目的是观察无性繁殖植物杂种后代实生苗的性状表现，学习掌握无性繁殖植物杂种后代的选择方法。

一、试材及用具

1. 试材

马铃薯（甘薯、甘蔗、咖啡、葡萄、菊花及山茶等）杂种后代实生苗材料及营养系各世代材料。

2. 用具

纸牌及线绳等标记物。

二、方法步骤

（一）多年生木本无性繁殖植物杂种后代的选择

1. 种子阶段的选择

不同的植物种子形态差别很大，一般选择充实饱满，生活力高的种子。有些种类的种子特征与将来成株性状有一定的相关性，要根据育种目标性状选择相应的种子。

2. 苗期阶段的选择

选择的内容通常包含苗期营养器官生长发育习性、对各种胁迫因素的抗耐性以及和花、果等经济性状相关的苗期性状等，统称为早期选择。通过早期选择淘汰不良的或希望较小的类型，减少育种圃中供选择的杂种数量，可使育种者把注意力集中到希望更大的类型，提高育种效率。早期选择的效果决定于苗期性状与成株性状的相关程度和育种者的经验和鉴别能力。从近年来的发展趋势看，苗期阶段的选择普遍侧重于抗病性的选择。

3. 成年阶段的选择

鉴定方法应注意简便、明确。杂种刚进入开花结果阶段，最初 1～2年花、果经济性状不太稳定，通常需要连续记载观察 2～3年，才能作出比较客观的评价。对杂种作出综合评价，大体上可以分为以下几类：

⑴ 优选类型

综合性状优良，符合育种目标要求，可提前繁殖，优先进入复选及多点试栽。

⑵ 候选类型

基本上符合育种目标的要求，个别性状不够理想，尚需进一步观察以决定取舍。

⑶ 留用资源类型

虽然综合性状不完全符合育种目标要求，但具有某些特殊可利用性状，可作为进一步育种的资源。

⑷ 淘汰类型

综合性状不良，没有特殊利用价值，应予淘汰的类型。

4. 营养系阶段的选择

育种圃中选出的优株通过无性繁殖成若干优系，以熟期相近的优良品种作对照，按品种比较试验的要求作复选试验，同时安排区域试验或多点试栽。等营养系结果后，将连续 3年比较试验结果连同入选母株的多年鉴定调查资料报有关部门审定。

㈡ 草本无性繁殖植物杂种后代选择

草本无性繁殖植物杂交育种的选择程序和方法，与多年生木本无性繁殖植物基本相同，其不同的特点就是实生苗世代选择期较短而营养系阶段的选择期较长。

㈢ 以马铃薯早熟育种杂种后代的选择为例

1. 实生苗世代的一次单株选择

首先要熟悉实生苗世代和薯生无性世代在熟性方面的相关性及早熟性与其他营养器官性状之间的相关性。通过育种工作者大量的调查研究，已经能在实生苗世代根据一系列性状的简单鉴定，相当准确地选择在无性世代中表现早熟的株系，从而大大节省无性世代需要培育的杂种株系。

⑴ 现蕾期较早，特别是植株较小的是早熟类型，但这一性状较易受环境影响，而与无性世代的熟性表现不完全一致。

⑵ 比较植株中部叶片，第一对小叶大于第二对者为早熟株。

⑶ 叶脉较稀疏且叶脉不太明显者为早熟株。

⑷ 杂交种子在 16 h长日照下播种育苗，子叶节发生匍匐茎早的为早熟株。

⑸ 实生苗 5～6片真叶期，具有开展性顶叶者多为早熟株。

⑹ 匍匐茎较短而不分枝者多为早熟株。

最后根据地上部分枯黄的早晚和收获时薯块发育情况选择早熟株。为了提高实生苗世代的选择效果，应在温室提前播种育苗，使实生苗移植到露地后的生长季节与薯生世代基本相似。

2. 营养系鉴定

实生苗收获时，入选株分株编号装袋，其余杂种表现较好的每株选一大小相似的块茎，连同入选株随即催芽秋播，对短休眠期及其中经济性状进行选择。第二年春季把实生世代入选的各

株系，和秋播第一无性世代入选的各株系一起分株系播种，进行株系间比较选择。在第二无性世代内就可以对各重要经济性状基本上作出鉴定，并从中选出参加品种试验的优系。这一育种程序和往年分在 3年进行相比，既可加快育种过程，又可节省工作量和防止优系落选，而且秋季世代的选择更符合生产中采用的二季作的情况。

三、作业思考题

1. 每人写 1份无性繁殖植物杂交后代植株性状遗传变异观察报告。
2. 无性繁殖植物和有性繁殖植物杂种后代的选择方法有什么差异？

（杨建平）

实验 56　植物品种比较与区域试验

品种比较试验简称品比试验，是育种单位在一系列育种工作中最后的一个重要环节。它要对所选育的品种作最后的全面评价，鉴定供试品种在当地的适应性和应用价值，选出显著优于对照品种的优良新品种，以便进一步参加区域试验。区域试验是由有关部门组织的、在一定的自然区域内的多点、多年的品种比较试验，以进一步鉴定新品种的主要特征、特性，确定其是否有推广价值，为优良品种划定最适宜的推广地区，并确定各地区最适宜推广的主要优良品种和搭配品种，同时研究新品种的适宜栽培技术，便于做到良种良法相结合。区域试验的试验方法，基本上与品种比较试验相类似，但要密切结合各地的主要栽培条件进行。因此，本试验以学习品种比较试验的方法为主。

本实验使得学生了解和初步掌握植物品种比较与区域试验的方法，学会品种比较试验结果的统计分析。

一、试材及用具

植物品种比较与区试的试验田、田间观察记载资料、产量结果及室内考种资料、计算器或计算机及各种统计表格等。

二、方法步骤

Ⅰ　品种比较试验

（一）品种比较试验材料的来源

主要是从鉴定圃选出的优良新品系和上年品比试验保留的品系，此外还包括外地新引进的优良品种。品种比较试验参试材料数目不宜过多，通常 10～15个。

（二）田间设计和布置

1. 试验区的面积和形状

一个品种种一个试验小区，小区面积较大，因植物种类和其他条件而异，小麦、水稻、大豆、花生、马铃薯、甘薯及早熟棉花一般是 20～40 m^2，高秆作物则要相应加大，一般在 30～60 m^2 范围内。试验小区形状可分为长方形和方形两种，它们各有优缺点。一般说，长方形小区可以获得较

大的精确性，这在试验田的土壤肥力不均匀时尤为明显。但长方形小区比方形小区易受边际效应的影响。因此，可根据具体情况决定小区的形状。如小区面积较大，试验田土壤肥力差异较大，各供试品种相互影响不大，宜采用长方形小区。

2. 重复次数

品比试验中每一个品种种几个试验小区就叫做几次重复。设置重复能减少试验地的土壤肥力差异以及其他偶然因素对试验结果的影响，是增加试验精确性的有效方法。有了重复，就可以了解和测定试验的误差大小，有利于对试验结果作出比较正确的评价。至于应该设几次重复，要视具体情况而定。试验田条件好，土壤肥力差异较小，小区面积较大的，重复次数可少些；反之，应多些。一般以 3～5次为宜。

3. 试验小区排列

一般采用随机区组设计。即先划分成几个区组，例如某一个试验共包含 8个品种，重复 4次，那么这一试验就有 4个区组，每一区组包含所有 8个品种的各一个小区。区组内各个品种小区的排列则是随机的，即每个品种都有同等的机会被放置在区组内的任何位置上，如图 7－1所示。

3	1	7	8	6	2	4	5	Ⅰ
1	3	4	5	8	7	6	2	Ⅱ
2	4	1	6	3	5	8	7	Ⅲ
5	7	8	4	2	3	1	6	Ⅳ

图 7－1 随机排列

Ⅰ，Ⅱ，…为区组号码；1，2，3，…为处理代号

4. 保护行的设置及其他

为了保证试验的安全和精确性，在每个区组的两旁、整个试验地的两端或四周，种植几行与对照相同的品种，称为保护行。还要考虑试验田中走道的设置。一般在区组间的走道要宽些，小区间往往不设置走道。试验田周围的保护行还应适当地设置出入走道。

（三）对试验的要求

1. 试验田要有代表性，不论在气候、地形、土壤类型、土壤肥力和生产条件等方面，都要尽可能地代表试验所服务的大田。尽可能要求地势平坦，形状整齐。土壤肥力要求均匀一致，尽量减少试验误差。

2. 试验地耕作方法、施肥水平、播种方式、种植密度及栽培管理技术接近或相同于大田条件，并注意做到全田管理措施一致。

3. 试验期间要严格系统地进行观察记载，结合成熟期的最后鉴定、产量结果和室内考种，对参试材料作出当年的综合评价和处理意见。各参试品种一般均参加两年以上的品比试验。

Ⅱ　区域试验

（一）参试品种的条件

申请参加区域试验的品种，必须经过连续两年以上的品种比较试验，性状稳定，增产效果显著，或者具有某些特殊优良性状，如抗逆性、抗病性强，品质好，或在成熟期方面有利于轮作等。

（二）划分试验区，选择试验点

根据自然条件和耕作栽培条件划分成若干个不同的生态区，然后在各生态区内选择有代表性的若干试验点承担区试。

（三）设置合适的对照品种

在自然栽培条件相近的各试验点，应以生产上大面积推广的优良品种作为共同对照。各试验点根据需要，可加入当地一个当家品种作为第二对照。对照品种的种子应是原种或一级良种。

（四）试验方法

与品种比较试验基本相似，不再细述。但要做到不同试验点之间统一参试品种，统一供应种子，统一田间设计，统计调查项目及观察记载标准，统一分析总结。区域试验一般进行 2～3年。

Ⅲ　随机区组设计品比试验结果的方差分析

在品比试验中各小区产量的差异是受 3个主要因素影响的，即品种本身的差异；每一重复存在着的土壤肥力的差异；偶然的误差。随机排列设计的品比试验结果可以用方差分析法进行分析，用方差来度量各种因素引起的变异，并通过该分析方法比较参试品种间差异是否显著。

如有 n个处理［包括参试品种（系）和对照品种共 n个］，重复 k次，即试验小区总数 N＝nk，则分析方法步骤如下：

（一）列出品比试验产量结果表（表 7－5）

表 7－5　品种比较试验产量结果表

处理名称	小区产量 /kg				处理和 (T_i)	品种（系）小区平均产量 /kg
	区组Ⅰ	区组Ⅱ	区组Ⅲ	区组Ⅳ		
CK						
A						
B						
C						
D						
E						
区组和 (T_j)						

（二）平方和和自由度的分解

1. 平方和的分解

矫正数（C）＝各小区产量总和的平方 /全试验小区数＝（ X）^{2} /N

总平方和 ＝各小区产量平方的总和 －矫正数 ＝ X^2 －C

区组间平方和 =(各区组和平方的总和 /每一区组内的处理数)-矫正数 = $(T_j)^2/n-C$

处理间平方和 =(各处理和平方的总和 /每一处理所占的区组数)-矫正数 = $(T_i)^2/k-C$

误差平方和 =总平方和 -区组间平方和 -处理间平方和

2. 自由度的分解

总自由度 =全试验小区数 -1=nk-1

区组间自由度 =区组数 -1=k-1

处理间自由度 =处理数 -1=n-1

误差自由度 =总自由度 -区组间自由度 -处理间自由度 =(n-1)(k-1)

(三)方差分析和 F测验

区组间均方 =区组间平方和 /区组间自由度

处理间均方 =处理间平方和 /处理间自由度

误差均方 =误差平方和 /误差自由度

区组间 F值 =区组间均方 /误差均方

处理间 F值 =处理间均方 /误差均方

将上述计算结果列成方差分析表 (表 7-6)。

表 7-6 品种比较试验产量方差分析表

变异来源	自由度 (df)	平方和 (SS)	均方 (MS)	F值	$F_{0.05}$	$F_{0.01}$
区组间						
处理间						
误 差						
总 和						

如果计算所得 F值大于 $F_{0.05}$值 (或 $F_{0.01}$值),说明处理间差异显著 (或极显著),可进一步比较参试品种间 (包括与对照品种)的均数差异显著性。以 t测验为例说明其方法。

1. 列出产量差异分析表 (表 7-7)

表 7-7 品种比较试验产量的 t测验分析表

品种	平均产量 /(kg/小区)	品种间均数的差及差异显著性				
(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)
A						
B						
CK						
E						
D						
C						

一般以小区平均产量从高到低的顺序，将参试品种名称填入表 7－7中“品种”栏，第 (2)直行是对应的各品种的平均产量。第 (3)直行是品种 A的平均产量与其他 5个品种平均产量的差。第 (4)直行是品种 B的平均产量与其他 4个品种平均产量的差。依此类推。

2. 计算小区平均产量差异显著最低标准

$$LSD_{0.05} = t_{0.05} \sqrt{\frac{MSe}{k} \times 2}$$

$$LSD_{0.01} = t_{0.01} \sqrt{\frac{MSe}{k} \times 2}$$

式中：$LSD_{0.05}$和 $LSD_{0.01}$——分别为在 5%和 1%显著标准时的产量差异显著的最低标准

MSe——误差均方，可由表 7－6直接查得

$t_{0.05}$和 $t_{0.01}$——从 t值表中查得，其自由度为 (n－1) (k－1)

3. 差异显著性比较

用差异显著最低标准衡量各品种两两之间产量平均数的差异显著性。若两个平均数之间的差异 $>LSD_{0.05}$，则表明差异显著，差异 $>LSD_{0.01}$，则差异极显著，差异 $<LSD_{0.05}$，则差异不显著。用一个星号“*”表示差异显著，两个星号“**”表示差异极显著，并标于每个差值的右上角。若两个均数之差不显著，则不标任何符号。

三、作业思考题

1. 结合具体的品种比较试验，进行田间主要性状调查记载和测产，并对试验数据进行方差分析和品种间产量差异显著性检验，写出试验总结报告。

2. 哪些因素可影响品种比较及区域试验的精确性，在实际工作中应注意哪些问题？

(胡延吉)

第八章　植物良种繁育技术

实验 57　植物杂交种制种技术

杂种优势是生物界的普遍现象，目前已广泛用于各类农作物。杂种优势的利用必须解决以下问题，诸如强优势组合，母本去雄，父本传粉和简单易行的制种技术。

植物杂交种制种是复杂的生产系统，主要包括确定种子田面积，设置隔离区，确定父母本间种植行比，调节播期确保花期相遇，田间去杂，母本去雄，父本传粉，杂种种子收获及加工等。由于各种植物的开花结实习性存在差异，所以在杂交制种的许多环节上处理方法也不同，突出表现在去雄、授粉和隔离区的设置等几方面。

母本去雄向来是利用杂种优势的一大难关。除雌雄异株的植物外，其他植物在利用杂种优势上，不管是单性花还是完全花，都必须解决杂交制种时母本的去雄问题。目前，母本去雄的方法可归纳为 3大类：人工去雄法、化学去雄法和生物去雄法。在本实验中只介绍人工去雄的杂交制种方法，其他的去雄方法，将在以后的实验中分述。

在杂交制种中，当母本开花时，父本应该供应数量充分而且具有授粉能力的花粉。在有些情况下，除天然授粉外，还要进行人工辅助授粉或放养蜜蜂。对于异交植物和常异交植物来说，由于长期自然选择作用，花器结构和开花习性都是适于向外散粉的，而且花粉量多，寿命长。但自交植物花粉量少，飞不远，有的甚至闭花受精，很不利于杂交制种。因此，自交植物在杂交制种确定父本时，要缩小制种田母本和父本行比，增加父本行。

本实验目的是学习掌握植物杂交种制种技术，获得杂交种子。

一、试材及用具

1. 试材

玉米、辣椒（或水稻、番茄及黄瓜等）父母本种子。

2. 用具

整地用具、镊子、70%酒精、脱脂棉、铅笔及纸牌等。

二、方法步骤

本实验以玉米和辣椒为例。

（一）玉米杂交制种技术

玉米为雌雄同株异花作物，雄蕊先熟，由于人工去雄杂交容易，玉米是农作物中最早利用杂种优势的作物。玉米利用杂种优势而组配的杂交组合形式很多，目前，主要是利用单交种。下面的实验是以单交组合，人工去雄为例的。

1. 选地播种

选地时要注意隔离。玉米花粉量极大,传播距离远,风媒授粉,是典型的异花授粉植物,很容易接受杂交组合父本以外的花粉。因此,种子田的隔离是保证种子品质的重要环节之一。种田采用空间隔离,隔离距离为 300 m。一般杂交种制种区隔离应在 200 m以上,自交系繁殖区要求更严格些,隔离距离不少于 400 m。具体距离可根据风力大小、风向、地势等酌情而定。因为蜜蜂也能传播玉米花粉,选择隔离距离要考虑蜂场的远近。除空间隔离外,也可用父本隔离,在制种区周围多种植父本,父本种植宽度一般要求达到 60 m以上。在夏玉米和秋玉米地区,也可采用春播制种进行时间隔离。双亲的播种日期要考虑到花期相遇。

2. 调节父母本行比

制种田生产一代杂交种子,在父本花粉够用的情况下,尽可能增加母本行数。目前多采用2∶8的父本与母本行比。具体的行比应视父本花粉量和当地情况而定,因素复杂,不能照搬。

3. 调节花期相遇

玉米花粉量大,雌蕊保持接受花粉的时间较长。但由于玉米生殖器官发育特点和对高温干旱十分敏感,玉米制种田有时也有父本花粉供应不上的情况。为了制种田花期相遇和供应充足的花粉,常采取以下措施:

⑴ 调整播期

制种田要根据父、母本的生育期调整播种期,在正常年份,一般调整播种期就可达到花期相遇,但在气候异常年份,则要注意花期预测,以便及早了解花期相遇情况。

⑵ 选择土壤肥沃地块作制种田

制种田应选择肥力较好,具备灌溉条件,旱涝保收的高产稳产地块,多施有机肥也是较好的抗旱措施,这样可保证玉米正常生长发育,免受干旱的不良影响。

⑶ 利用栽培技术措施

这可促进或延长父、母本的花期,如对因生育迟缓,花期可能不遇的亲本,可用边追肥边灌水的办法促进其早吐丝或抽雄,间苗或补苗时,在父本行适当留几株三类苗,也有延长供粉期的作用。

4. 去杂去劣

要抓住苗期、拔节后抽穗前和收获脱粒时机 3次去杂。苗期去杂可结合间苗定苗进行,根据苗色、叶鞘色和叶片宽窄来识别。拔节后抽穗前去杂,是根据株高、株型和叶片宽窄识别,特别注意去掉那些高大的杂种植株。收获脱粒时,可根据果穗形状、粒型、粒色、轴色等特性,将杂穗去掉。

5. 母本去雄

母本去雄时要求拔除全部母本行的雄穗,使母本只接受父本行的花粉,达到杂交目的。母本去雄必须做到及时、干净、彻底。及时是指母本雄穗在散粉前拔除,干净是指把母本雄穗整个拔除,不留残枝,彻底是指把全区所有母本雄穗不漏拔除。这 3项去雄指标,必须做到。

母本去雄一般是 8∶00—11∶00为宜。当植株雄穗主轴顶端抽出顶叶达 1/3高度时,是去雄的最适时期。因为这时未散粉,雄穗颈基部脆嫩,易于将整个雄穗拔除。去雄过早,往往带残叶过多,抑制生育,而且容易拔断分枝,使雄穗基部分枝折断在心叶内,去雄不干净。去雄过晚,雄穗颈部硬化,不易拔除,还有散粉的可能。

去雄要坚持每天上午逐垄拔一遍，不让母本有散粉的机会，尤其是开花盛期，要做到风雨不误。去雄末期，全地块只剩下不到 10% 母本还没有抽雄时，就可以一次全部拔干净。去雄不要漏下分枝，也不要损伤茎叶。拔下的雄穗随即带出田外，沤肥或做饲料，不可随地乱扔，免得花粉飞散造成混杂。去雄全部结束后，隔 2～3 d还要到制种地全面检查一遍，以免留下漏拔母本雄穗。全田去雄工作一般要持续半月左右。

6. 提高结实率

提高结实率的措施有以下几种：

⑴ 剪短母本雌穗苞叶

如果母本开花晚于父本，把母本雌穗苞叶的顶端剪去 3 cm左右，可使母本提前 2～3 d吐丝，提早去雄也有促进雌穗吐丝的作用。

⑵ 剪母本花柱

父本花粉晚于母本吐丝时，如时间长，造成母本花柱伸出过长下垂，则影响下部花柱授粉，可把母本花柱剪短，留 1.5 cm即可，有助于授粉结实。如果不剪，母本将会有半边穗不结实，影响产量和品质。

⑶ 种植采粉区

在制种田边单设一小块采粉区，将父本分期播种，供人工辅助授粉用。

⑷ 变正交为反交

如果父本散粉过早 (5～7 d)，可将原来的父本改做母本 (去雄)，将原来的母本改做父本 (不去雄)，使花期达到相遇。由于原来父、母本的行数是按比例种植的，父本行数少，将父本改做母本后，制种田的产量要减低。因此，该法在万不得已的时候才用。

7. 收获贮藏

玉米的种子大，胚也大，脂肪含量高，种子吸湿性强，脱水慢。因此，要求适时收获，以便使种子在贮藏前有充分的时间干燥，使玉米种子在入库前含水量降至 14%，达到安全贮藏。

一般来说，玉米达到完熟期为适宜的收获期，这时苞叶变黄松散，子粒变硬，并显现出本品种固有的色泽。至于全株是否枯黄，则因亲本系而异。这时穗轴的水分高达 50% 以上，种子含水量达 22% ～30%，如果不及时干燥而贮藏，遇热会发霉变质，遇到温度过低，胚部受冻，会降低发芽能力。玉米进入腊熟后期，果穗的干物质不再增加，主要是脱水干燥过程，当日平均气温降到 14.5 ℃以下时，玉米即完全停止干物质的增加。玉米成熟期遇到 3 ℃的低温完全停止生长，如遇到 －3 ℃的寒冷气候，果穗中未充分成熟而含水量又高的子粒就会丧失发芽能力。因此，在北方生育期短，秋季气温下降快的地区，当日温平均在 14 ℃左右时，玉米达到腊熟末期就该进行收获，将玉米秆带穗砍倒后，在田间晾晒。

（二）辣椒杂交制种技术

辣椒为常异花授粉作物，因而杂种一代种子生产主要是人工杂交制种，同时辣椒为单株果数和单果种子数较少的蔬菜，因而要提高种子产量和品质，首先必须提高选留部位的坐果率和单果种子粒数，同时配合其他技术措施。

1. 育苗定植

双亲播种期的确定要考虑当地的气候条件和双亲花期相遇，定植于简易塑料大棚内。父母本的比例为 1∶2.5～1∶3，母本单株、父本双株定植。制种日期以安排在日均温 18～26 ℃，多晴

季节为好。

2. 调节花期并进行防虫

培育好父、母本，调节好花期，并于开花前 1～2周连续喷 2～3次 800倍敌百虫或 4 000倍 20%杀灭菊酯防钻心虫。

3. 去杂除劣

杂交前，去除杂株、劣株及已开之花、果。选用 2～4层的花授粉，结实率高，成熟期集中。为使第一层的门椒落花，使 2～3层同时开花，可以在门椒 50% ～60%开花时，浇一次大水，并施用速效 N肥，2～3 d后则大量花落，未落的再行人工摘除。

4. 去雄

去雄于开花前一天 15∶00—16∶00进行，为防止非目的性杂交，可将脱脂棉拉成薄片套在花上，此法简单，不易掉，且通风透光，又可作为标记，授粉后 3 d去除。去雄一般用镊子进行剥花去雄，也可采用徒手去雄法，即用左手稳住蕾柄，右手指轻握花冠半周，脱去花冠，带出全部雄蕊。也有报道辣椒可用化学去雄法。

5. 授粉

授粉时间是，当气温 22～24 ℃时，以 7∶00— 9∶00授粉最好，当白天气温高于 30 ℃，夜间温度在 20～25 ℃时，以下午授粉最好。授粉方法以重复授粉效果好，有人试验授 2次比 1次结籽数提高 64. 1%。

6. 留种

单株留种果数，大型果以留 6～8个为宜，小型果可留 30个左右。

7. 采收种子

辣椒在果实完全变红时立即取种，种子发芽率及千粒重最高，而在植株上过熟或再经后熟则发芽率反而有下降的情况，因此，种果要及时采收。未完全老熟的褐紫色果实采收后，后熟至完全变成红色时取种，种子发芽率及千粒重与在植株上老熟者相似，因此，当条件不利时，种果采收期可适当提前，但需经后熟再取种。

三、作业思考题

1. 每人按教师指定写出 1份植物的杂交制种实施方案。

2. 在植物杂交制种的技术环节中，你认为哪几个环节是最重要的，这几个环节的注意事项是什么？

（潘敏）

实验 58　植物雄性不育系制种技术

两性花作物中，雄性器官表现退化、畸形或丧失功能的现象，称为“雄性不育”。雄性不育是可以遗传的，通过一定的选育程序，可以育成不育性稳定的系统，称为“雄性不育系”。利用雄性不育系配制一代杂交种，只要将不育系和可育的父本系种植在同一隔离区内，自由授粉或人工授粉，从不育株上采收的种子就全部是杂交种。

利用雄性不育系作母本系生产一代杂交种，对发展杂种优势有着极为重要的意义。首先是

可以扩大杂种优势的利用范围。第二，节省人力、物力，降低杂种种子的生产成本。第三，提高了杂种种子的品质。

生产上利用雄性不育系制种，主要是利用两用系制种和利用质核（互作）不育系制种。所谓“两用系”就是同一系统既作不育系，又作保持系用。由一对核基因控制的不育性，用不育株作母本，杂合可育株作父本，从不育株上收获的种子播种后，群体内可育株和不育株约成 1∶1分离。这样的系统在隔离区内繁殖，每代只播种不育株上的种子，就能保持稳定的 1∶1分离，故可以作两用系用。利用两用系制种时按照一定的行比栽植两用系和父本系，但两用系的株距应缩小，使栽植的株数约增加一倍，在初花期拔除两用系的可育株，以后从剩下的不育株上收获的种子就是一代杂种。

利用质核（互作）雄性不育系的制种法，就是在不育系繁殖区内，栽植不育系和保持系，目的是扩大繁殖不育系种子为制种区提供制种的母本；不育系繁殖区同时也是不育系和保持系的保存繁殖区，即从不育系上所收获的种子除大量供播种下一年制种区之用外，少量供播种下一年不育系繁殖区之用，而从保持系行上收获的种子仍为保持系，可供播种下一年不育系繁殖区内的保持系之用。在制种区内栽植不育系和父本系，从不育系上收获的种子为一代杂种，从父本系行上收获的种子仍为父本系，可供播种下一年制种区内父本行之用，故制种区同时也是父本系的繁殖保存区。

本实验目的是了解不同的雄性不育类型在植物杂交制种中的利用情况，学习掌握利用雄性不育系制种的技术，获得杂交种。

一、试材及用具

1. 试材

小白菜（或向日葵、萝卜、油菜、水稻及高粱等）的雄性不育系及父本系。

2. 用具

整地用具等。

二、方法步骤

本实验以利用雄性不育两用系的小白菜制种为例。利用质核（互作）雄性不育制杂交种，与本实验的区别主要有两点：一是母本内没有可育株，二是亲本繁殖时，多了保持系的自繁。

（一）雄性不育两用系的繁育

1. 雄性不育两用系原原种的繁育

由于花粉污染、基因突变或机械混杂等原因，用于杂交制种的雄性不育两用系，其不育株率常出现下降的问题。为了防止雄性不育两用系不育株率的下降，应采取以下措施：播种雄性不育两用系的种子，从苗期到产品器官形成期，应进行严格的选择，淘汰不抗病、经济性状不典型的植株，保留抗病性好，综合经济性状优良的植株（可保留 60～100株），留作种株。种株开花后，以不育株为母本，可育株为父本，进行成对授粉，可以作 10～20对，其余的种株拔除。各不育株上的种子分别采收。须注意，授粉前后要有严格的隔离条件，并严防授粉时花粉污染。将各不育株上采收的种子分别留种、播种、初花期检查不育株率，将不育株率低于 50%的株系淘汰，余者进行沙网内人工授粉，授粉结束后，拔除可育株。将各不育株上的种子混合采收，即可作为雄性不

育两用系的原原种。

2. 雄性不育两用系原种的繁育

利用两用系原原种扩大繁育原种。两用系制种田一般采用自然隔离，即与大白菜、菜薹、白菜型油菜、芥菜及白菜类其他品种的采种田隔离距离应在 2 000 m 以上。两用系原原种播种后，要加强田间管理，采种田株、行距可同一般采种田。种株开花后，要逐株进行育性检查，在不育株主茎上拴绳或涂红漆做好标记，盛花期过后最好将可育株拔除。如果不拔除可育株，收获时须先收不育株。这样，从不育株上收的种子即为雄性不育两用系的原种，可用其进行杂交制种，在可育株上收的种子可用于榨油或作为一般种子栽培。

（二）杂种一代的杂交制种

1. 选地

少量的杂交制种，可以在防虫网内进行，但必须采取人工辅助授粉或放蜂传粉。大量制种时，种子田的选择要注意隔离要求。由于小白菜雄性不育株易接受外来花粉，所以制种田应杜绝非父本花粉的传入。一般多采用距离隔离法，隔离距离应不少于 2 000 m。

在我国南方地区，有的采取时间隔离法，即将小白菜杂交制种田双亲的播期与周围生产田中的白菜、菜薹、大白菜等易与小白菜自然杂交的作物错开，达到错开花期的目的。播种期错开多久，必须依照小白菜杂交制种田不同季节开花期的长短而定。但此法易受当年气候的影响，使花期长短变化而难达到隔离的目的。

2. 确定播种时间

播种要根据当地的气候条件和双亲的开花习性，确定双亲的播种时间，以求达到花期相遇。

3. 双亲的行比与种植规格

杂交制种田父母本的种植比例，原则上是在不影响母本授粉结实的情况下，要尽量减少父本的数量。例如，坡头 ×高脚黑叶和黑叶坡头 ×高脚黑叶两个杂交组合，因父本高脚黑叶的花粉量较多，一般采用父 ∶母本为 1∶4或 1∶5的种植比例。

种植规格须根据亲本种株的特征特性和季节而定。一般是亲本种株高大的，其行距和株距要大些，反之要小些。秋播要比冬播的行距大些。广东的小白菜杂交制种田，一般畦宽 1. 65～1. 8 m，栽 5行，父 ∶母本为 1∶4或栽 6行，父 ∶母本为 1∶5。但是母本雄性不育两用系的株距为 12 cm，父本的株距为 24 cm。

4. 调节花期相遇

杂交制种田，双亲花期能否相遇和一致，是确保种子品质和产量的重要环节。控制双亲花期相遇，除在播种时考虑错开播期外，还可采取下述 2条措施：

⑴ 花序整枝法

小白菜的花序属于无限花序类型，可以通过摘除主花茎的方法，延迟其开花期，使其与开花期晚的亲本的花期相遇。在错开播期后，双亲花期仍未能相遇时，多对早开花的亲本实行摘除主花茎，甚至摘除一次侧枝顶心的做法。

⑵ 春化处理法

小白菜属于种子春化型的作物，可将萌动的种子进行春化处理，使晚开花的亲本早开花，从而使其双亲花期相遇。例如，根据父本高脚黑叶的开花期比母本坡头或黑叶坡头两用系迟 15 d 左右开花的情况，可将父本高脚黑叶的种子提前浸种使其萌动后，放于冰箱中，在 0～2 ℃下处理

12～15 d,然后再与母本同时播种和定植,也可使双亲花期相遇。当然,迟开花亲本春化处理时间应根据其冬性强弱而定,经试验验证后,再大量应用。

5. 花期处理

花期最好放蜂,使母本充分授粉,有利于提高种子产量。同时,要彻底拔除母本行中的有粉株。因为母本雄性不育两用系中,一般有 50%的不育株和 50%的可育株,为确保制种田的结交率,必须在刚开花时拔除母本行中的有粉株。具体做法是:当母本行刚有开花的种株时,即逐株检查,拔除有粉株,并将不育株上已开的花摘去,或将开花的主花茎摘除,防止两用系母本发生系内兄妹交。在制种田进入初花期后,要求每天 9:00前检查和拔除母本行中的有粉株 1次直至将母本行中的全部有粉株拔完为止。不育株与可育株在花器构造上差异明显,易于识别。拔除母本行中有粉株的工作,一般须持续 9～15 d才能完成。

6. 种子收获

杂交制种田种子成熟后,应及时收获,防止落粒。父、母本种株必须严格分收,一般是先收母本种株,其种子即为杂种一代。父本种株可晚收,其种子仍为父本种子。在晾晒、脱粒、清选、包装种子时,应严格防止母本种株上的种子与父本种子发生机械混杂。种子晒干后入库贮藏。为了更有效地防止制种田父、母本种株上的种子发生机械混杂,也可在盛花期过后,立即将父本行种株拔除。

三、作业思考题

1. 查阅资料,写出雄性不育系已在哪些植物的杂交制种中得到了广泛应用。
2. 每人按教师指定写 1份利用雄性不育系制种的实施方案。
3. 植物雄性不育系在选育、转育和繁殖过程中应该注意哪些问题?

(杨建平)

实验 59 植物化学杀雄制种技术

化学去雄是利用某些化学药剂抑制或杀死母本上的雄花,以减少摘除雄花的麻烦,从而提高工作效率,降低杂种种子的成本。虽然利用雄性不育性和自交不亲和性等遗传育种途径可以解决制种问题,是经济、省工、行之有效的途径,但是,育成这类适合于做杂交亲本的系统有时并不容易,因此,化学除雄作为制种时节省人工的一条途径,近些年来一直在不断的研究探索中。

目前,已报道过的主要除雄剂有:乙烯利、青鲜素、二氯乙酸、二氯丙酸钠 (达拉朋)、三氯乙酸、二氯异丁酸钠 (FW 450)、三碘苯甲酸 (TIBA)、二氯苯氧乙酸 (2, 4－D)、核酸钠、萘乙酸、矮壮素 (CCC)、DPX 3778 (一种铵盐)等。

化学杀雄剂的使用方法一般都采用水溶液喷雾法,喷雾时期一般在花芽开始分化前,为了保持较持久的效果,需要间隔适宜时日重复喷雾多次。利用化学药剂杀雄制种时,必须要求药剂具有以下特性:处理母本后仅能杀伤雄蕊,使花粉不育,不影响雌蕊的正常生长发育,处理后不会引起遗传性变异,处理方法简单,药剂要便宜,效果要稳定,对人、畜无害。

化学杀雄利用杂种优势的最大优点是方法简便易行,亲本来源广泛,组合选配自由,不需"三系配套",不受母本不良不育细胞质的影响,制种成本低,有很好的发展前景。但目前,广泛

应用于生产的并不是很多，许多药剂的使用方法、效果及残留问题都有待于试验。

本实验目的是掌握常用化学杀雄剂的使用方法及利用化学杀雄的制种技术，获得杂交种子。

一、试材及用具

1. 试材

黄瓜或油菜、辣（甜）椒、小麦及水稻等的父、母本种子。

2. 用具

整地用具、100 mg/L、150 mg/L、250 mg/L的乙烯利或其他杀雄剂及喷雾器等。

二、方法步骤

本实验以黄瓜化学去雄法制种为例。

黄瓜化学去雄制种，每年需设两个隔离区，即一个母本（系）繁殖区，一个杂交制种区。同时繁殖父本品种（系），即在制种时由父本行中挑选符合要求的植株扎花人工授粉繁种，或自然授粉选株留种。

（一）选地播种

制种地周围 1 000 m范围内不种植其他品种的黄瓜，播种时要考虑父、母本花期相遇。

（二）父、母本的种植比例

父、母本按 1∶2～1∶4行栽植。

（三）合理确定父、母本花期

为使双亲花期相遇，应使父本雄花先于雌花开放。

（四）化学杀雄处理

当母本苗的第一片真叶达 2.5～3.0 cm大时，喷浓度为 250 mg/L的乙烯利，3～4片真叶时喷第二次（150 mg/L），再过 4～5 d喷第三次（100 mg/L）。必须注意喷乙烯利的浓度和时间，因为浓度越高，则节间越短（植株矮化），畸形果越多，种子千粒重越低，也易落蕾。母本植株经处理后，20节以下发生的基本上是雌花，任其自然授粉杂交，种瓜成熟后采集的种子即为杂交种子。

（五）实行人工辅助授粉和辅助去雄

授粉适期如遇连日阴雨，可进行人工辅助授粉；进入现蕾阶段后，经常检查并摘除母本植株上出现的少量雄花。

三、作业思考题

1. 每人按指定植物进行化学去雄处理，并写出实验报告。

2. 利用化学去雄制种的优、缺点是什么？将来化学杀雄剂的发展方向是什么？

（杨建平）

实验 60　植物自交不亲和系制种技术

通过连续自交选择，育成系内株间花期相互授粉结籽很少，甚至不结籽的系统，称为自交不

亲和系。利用自交不亲和系作为亲本系进行杂交制种，可以获得近于 100% 的杂交率。自交不亲和系的利用，使一些花器小，去雄困难的植物，特别是一些十字花科植物的杂种一代种子广泛应用于生产。

利用自交不亲和系制种，首先要选育出自交不亲和系。一般采用单株连续自交、分离、选择法，基本上与自交系的选育相同。不同之处在于增加了亲和指数的测定这一环节。亲和指数 = 花期人工授粉结籽数 / 单株花期人工授粉总花数。自交不亲和系育成后，要进行自交不亲和系的繁育，以便扩大其群体用于杂交之用，这就需要找到自交不亲和性的克服方法。

利用自交不亲和系制种，双亲可以同时为自交不亲和系，也可以母本为自交不亲和系，父本为自交系。在制种时，需要设立自交不亲和系（母本）繁殖、父本繁殖和杂交制种 3 个隔离区。

本实验目的是学习掌握植物自交不亲和性制种技术，获得杂交种。

一、试材及用具

1. 试材

大白菜（或油菜、甘蓝、花椰菜及萝卜等）的自交不亲和系及自交系。

2. 用具

镊子、纸袋、纸牌、回形针、铅笔、2% ～3% NaCl 水溶液、鸡毛掸及整地用具等。

二、方法步骤

（一）自交不亲和系的繁殖

1. 蕾期授粉

⑴ 剥蕾

把未开放的花蕾用镊子挑开（不必去雄），让柱头外露，即为剥蕾。方法是从花蕾的下部，选取开花前 2～4 d 的花蕾进行剥蕾，每隔 3 d 左右再向上剥蕾一次。在田间剥蕾时，需预先套袋；在网室剥蕾时，则可不必套袋。

⑵ 授粉

花蕾剥开后，摘取袋中本株当天开放的花朵，逐个授粉自交。花粉必须授到剥开的花蕾的柱头上。

⑶ 作标记防混杂

剥蕾授粉后，应立即套袋，并在该剥蕾花序基部挂上纸牌作好标记，以免收获时混杂。

⑷ 及时摘下纸袋晒太阳

袋中剥蕾授粉花的花瓣脱落后，要及时取下纸袋，让角果见太阳正常发育。

⑸ 收获

要按照标记将剥蕾授粉的植株收获。利用隔离制种区母本行进行剥蕾授粉繁殖的自交不亲和系，收获时必须把剥蕾株全部收尽，以免混杂，影响制种品质。

2. 花期喷洒 NaCl 水溶液

开花后，用 2% ～3% 的 NaCl 水溶液进行喷洒，每隔 1～2 d 喷一次。用鸡毛掸进行人工辅助授粉。经过实验证明，花期喷洒 NaCl 水溶液可以克服自交不亲和性。其原理是：NaCl 与雌蕊柱头上的识别蛋白发生反应，产生蒙导作用，使得柱头与花粉的亲和力得以提高，进而提高花期系

内自交的种子产量。在喷洒 NaCl溶液时，浓度不能过大，以 2% ～3% 为宜。否则，高浓度的 NaCl会使叶片和柱头失水，影响结实。一般以每隔 1～2 d喷一次为宜。在利用大网棚进行采种时，可于喷 NaCl溶液后，放蜜蜂辅助授粉；在利用隔离区采种时，也可用鸡毛掸、海绵块进行人工辅助授粉。人工辅助授粉动作宜轻，不损伤柱头，授粉力求均匀。

除上述两种方法外，也可以利用增加授粉期间环境中 CO_2浓度，或用钢刷授粉和电助授粉来繁殖自交不亲和系。

（二）父本的繁殖

在父本繁殖区，选留典型植株自交或姊妹交，作为下年父本繁殖区的原种，其余去杂去劣后，作为下年制种区的父本种子。

（三）自交不亲和系杂种的制种

在杂种制种区中进行。

1. 播种育苗

播种时期根据植物的最适定植期和苗龄确定。大白菜春季育苗采种的苗龄为 60～70 d，以幼苗长有 6～7片叶定植为宜。各地定植适期以 10 cm地温稳定在 5℃以上为宜，由此向前推算 60～70 d即为播种适期。另外，播期的确定还要保证制种田双亲花期相遇。利用自交不亲和系制种，理想的花期相遇是父本、母本的初花期、终花期都一致。播种前，将苗床浇足底水，水渗后点播，即在每个营养土块中央放一粒饱满的种子。播后覆土 1～1.5 cm，盖严薄膜，傍晚加盖苫子，白天上午揭开。播后要尽力提高苗床温度促进出苗，一般经 8～10 d苗可出齐。苗出齐后，白天温度可控制在 18～22℃，不可超过 26℃，夜间温度以早晨揭苫时床温 1～4℃为宜。

2. 整地定植

⑴ 选地整地

确定制种地块时，首先要考虑到大白菜制种的空间隔离要求。大白菜不同品种间或大白菜与白菜、芜菁、菜薹、白菜型油菜、甘蓝型油菜及芥菜型油菜等采种田，一般需隔离 2 000 m以上。在隔离区之间有树林、村庄、山峦等障碍物情况下，隔离也要在 1 500 m以上。此外，在隔离区内栽培的春白菜之类的生产田，如有抽薹现象，应及时收获，否则，视隔离区不合格。

制种地块忌与十字花科蔬菜连作，最好选择 2～3 a未种十字花科蔬菜的地块安排制种。制种地块确定后，除施足农家肥外，还要特别注意增施磷肥和钾肥。一般每亩（$1 hm^2$ ＝15亩）施过磷酸钙 30～40 kg，硫酸钾 10 kg。

⑵ 定植

在定植适期内，早定植比晚定植有利。在定植适期要注意收听天气预报，抓住寒流刚过的时机定植。这样，当下一个寒流来临时，苗已长出新根，抗寒力已较强，不易遭受冻害。

⑶ 定植行比

若双亲为自交不亲和系和自交系，父、母本按 1∶1或 1∶2的行比相间种植，在母本上收种子。如果双亲都是自交不亲和系，且正反交差异不显著，可以混合收获的，双亲行比应为 1∶1。正反交差异显著的，则正交组合（较优组合）的母本行与另一亲本行的行比为 2∶1。

⑷ 定植密度

定植密度应考虑到双亲生长势的强弱。高代自交不亲和系大多生长势较弱，每亩（$1 hm^2$ ＝15亩）定植 4 000～5 000株。

3. 田间管理

定植时秧苗已花芽分化，从定植到开花一般需要 30多天，定植后主要管理措施如下：

⑴ 浇水

浇足缓苗水后，主要是加强中耕，提高地温。一般在现蕾前不旱不浇水，当种株 75%以上抽薹 10 cm左右时，可开始浇水，此后直到盛花期过后，要及时浇水，使土壤保持湿润状态，切忌干旱。当花枝上部种子灌浆结束开始硬化时，要控制浇水，雨后要注意排涝。适当高温干燥有利于种子成熟。

⑵ 追肥

在基肥比较充足的情况下，一般不需追肥。但对于土壤肥力较差的地块，种株抽薹开花后可能会出现缺肥现象。如新叶表现黄化是缺氮迹象，应立即追施氮肥，一般亩施尿素 10 kg左右（1 hm^2 =15亩）。

⑶ 调整花期

为使双亲花期相遇，在播种日期上已做过相应安排。但由于年度间气候差异，双亲花期仍可能出现偏差，因此，必要时可对抽薹过早的亲本行重摘心，通过重摘心延迟花期，促使下部侧枝萌发，从而起到调整花期的作用。

⑷ 放养蜜蜂

在大面积集中制种时，传粉昆虫不足的问题十分突出。各地经验认为，一般每 1～2亩 1亩 $=\frac{10\ 000}{15}m^2$ 地应放养一箱蜜蜂。同时，为保护昆虫传粉，制种田花期要避免使用杀虫剂，应在花前搞好虫害防治。

⑸ 防治虫害

大白菜开花期间的主要害虫有蚜虫、菜青虫、小菜蛾等，而开花期又不便喷药，这就要求在开花之前，针对上述害虫每隔 5～6 d喷一次药，连续喷药 3～4次。

在制种田进入终花期（始花后 30 d左右），75%有效花序开花授粉已结束时，要及时撤走蜜蜂。然后，随即喷药 2～3次，严格控制虫害。否则，蚜虫、小菜蛾等可能在数天内造成惨重损失。

⑹ 收获

当种株半数角果变黄时，即可在清晨割收种株。利用自交不亲和系和自交系制种的，只收获自交不亲和系上的种子。双亲都是自交不亲和系且正反交差异不显著的可混收，差异大的正反交分别收获。在种株后熟、脱粒、清选、干燥、贮运过程是，切忌品种错乱和机械混杂。晴天晒种不可在水泥地上摊薄曝晒，以免烫伤种胚。未晒干的种子不可装袋或大堆存放，以免种子发热丧失发芽力。

三、作业思考题

1. 练习自交不亲和性的克服方法，并写出实验报告。
2. 每人按教师指定写出 1份利用自交不亲和性制种的实施方案。
3. 优良自交不亲和系应该具备哪些条件？
4. 自交不亲和系在选育、繁殖和制种的过程中的注意事项是什么？

（杨建平）

实验 61　无性繁殖植物良种繁育技术

无性繁殖植物，在其繁殖过程中，前代与后代的各个个体之间很相似（变异少），但有时也会发生变异，特别是退化的植株，有时较多，如病毒侵染株。因此，为了保证无性繁殖植物品种纯正的种性，在留种时也要进行严格选择。通常采用的选择法，有营养系单株（穴）选择法和营养系混合选择法。这两种方法的选择程序与有性繁殖植物的单株选择法和混合选择法基本相同，差别之处，只是每一代用以繁殖下一代的不是种子，而是无性繁殖器官，如块茎、鳞茎和球茎等。有些植物在生产栽培中虽采用无性繁殖，但也能开花结籽，或经某种处理后，能开花结籽。对这类植物，可利用它们的有性后代的分离变异，经过选择，获得优良植株，再经无性繁殖，使其优良性状在后代固定下来。

无论采用哪种选择方法选择出来的种株，都应该将其尽快繁殖出足够数量的播种材料，扩大鉴定群体，以便在生产上发挥作用。本实验只介绍马铃薯和黄花菜的繁殖方法，并练习几项实际操作技术。其他无性繁作物的繁殖技术，让学生通过查阅资料和课外生产调查去掌握。

本实验目的是学习无性繁殖植物的营养系选择方法，掌握无性繁殖植物的留种技术，练习对无性繁殖器官的分割、栽植前的处理等几项实际操作技术。

一、试材及用具

1. 试材

马铃薯、黄花菜或大蒜、莲藕、甘薯、甘蔗、苎麻、菊花及月季等。

2. 用具

钢卷尺、秤、整地工具、刀片、竹竿、塑料挂牌、记号笔及铅笔等。

二、方法步骤

（一）马铃薯的繁殖法

1. 原种的繁殖

进行原种繁殖的种薯，可以利用脱毒苗进行培养繁殖，也可从无性系获得，具体做法是：

⑴ 单株选择

在马铃薯开花期选择生长势强，无退化表现，并具有品种典型性状的植株，一般预选 500～1 000株，作好标志，生育后期到收获前复查一二次。如发现有病及早衰的植株，要随时拔除。将高产、无病，具有典型薯形的单株，单收单藏。

⑵ 株行圃

每个中选单株种 5～20株作为一个株系，每 5～10个株系种一对照品种。生育期间进行多次观察或结合指示植物、抗血清法鉴定，严格淘汰病毒株和低劣株行，选留优良高产株行。

⑶ 株系圃

将选留的株系进行鉴定比较，可采用对比法，重复二三次，小区面积 0.01亩　1亩 $=\frac{10\ 000}{15}\ m^2$。严格淘汰劣株系，入选高产，生长整齐一致，无退化症状的株系，混合后作下季原种圃的种薯。

⑷ 原种圃

在苗期、开花期及收获前要多次拔除病、杂、劣株，留下的即为原种。再扩大繁殖一次后，供生产基地繁殖良种。

2. 种薯的快速繁殖

⑴ 选地留种

在马铃薯收获时，选留种薯可单薯选或单株选。不管采用哪种方法，都要先进行地上部分选择，即根据田间植株生长情况，选择生长势旺盛，无病虫害（尤其是无病毒病），且具有本品种特征的优良植株作预选种株，并用竹竿或塑料牌加以标记。到收获时，再在已预选的优良单株中进行块茎的选择。选择块茎的标准是：

①块茎大而整齐，色泽一致。

②匍匐茎短，结薯集中。

③薯块表面光滑，芽眼分布均匀而浅。

最后，对入选的优良单株和薯块分别编号，记载薯块数目，称其质量，再装入袋中贮藏。

⑵ 种薯处理

北方春播，为了促进发芽、芽齐、芽壮，可利用温室、阳畦条件，保持温度 20 ℃左右，进行催芽。南方秋播，因种薯尚未解除休眠，要进行打破休眠的催芽处理，可用 0.5 mg/L左右赤霉素水溶液把种薯切块浸 10 min，晾干后播种。当气温较高时易烂种，宜选择通风凉爽，排水良好，没有阳光直射的地方做苗床，床温应保持在 20～25 ℃为宜。

⑶ 切薯

苗床做好后，将种苗纵切 4块或 6块，如果薯块大，可按芽眼的多少再横切二三份，但必须保证每个切块都有一个芽眼。横切时刀口要贴近芽眼，因为空气是通过切口进入薯块内部的。切口离芽眼越近，越容易打破休眠，出芽越快而整齐。

⑷ 上床

薯块上床时，要均匀地摊成一层，尽量不使薯块重叠。薯块上床后，要随即盖上一层湿润的沙土，厚约 3～4 cm，这叫单层催芽法，采用这种方法，可在幼苗出土，并长出绿叶后移栽。也可采用多层催芽法，即一层薯块一层湿沙排放好，每层沙土厚约一指左右，可根据薯块数量和苗床面积分成 3至 5层，最后一次盖湿沙土厚 3～5 cm，以防吹干。薯块一般 5～6 d可抽生小芽，出芽后即可栽种。

（二）黄花菜的繁殖法

黄花菜是百合科萱草属中能够形成肥嫩蓓蕾的宿根类多年生草本蔬菜，它的繁殖过程和方法如下：

1. 留种株的选择

留种株的选择标准是：

⑴ 植株健壮而紧凑，无病害，具有本品种典型性状。

⑵ 叶片短而肥厚，颜色较深。

⑶ 花薹粗壮，一般应有 4～8个花枝。

⑷ 花蕾大，花瓣肥厚。

2. 繁殖方法的大致程序

目前，常用的无性繁殖方法有如下 3种。

⑴ 分蔸法

这是生产上常采用的方法，可结合更新复壮进行。其方法是：在秋季中耕时，从每丛中选株的一侧，连根挖去 1/3的老蔸，使其挖动的地方从短缩根状茎的茎节处发生新的分蘖，形成新苗，把新苗进行分株繁殖；挖出来带有根的老蔸，可用剪刀分割成单株，将地上部分与根修剪整理后，直接栽到新发展的黄花菜菜地里。

另外，还可以在需要更新复壮的老黄花菜地里，挖出全部老蔸，淘汰部分性状不好的单株，重新翻土作畦，再将挖出的入选老蔸分成单株，选择健壮的作种苗栽植。在秋季栽植，当年即可长出秋苗，第 2年就能抽薹结花蕾。在春季萌芽前栽植，当年可长出春苗，但一般在第 2年抽薹结花蕾，第 3～4年可获得一定的产量。

⑵ 切片繁殖

切片繁殖既可增加繁殖系数，又保持了营养繁殖的优点。其具体做法是，选择 3年以上的黄花菜的优良植株，将其整株挖出，割去叶片，把根剪短到 5 cm左右，然后进行纵切，每蔸可纵切成 2到 10余片，但以每蔸切成 2到 4片为宜，由它长出的植株为最好。切片繁殖的适宜时期，一般为立秋后半个月和第二年清明前后，适温为 20 ℃左右。切片要及时栽植，7～8 d后开始萌发。为了防止伤口感染病菌，蔸在切片前可用 1∶1∶100的波尔多液处理。为促使栽植后发生新根，可用 10 mg/L的吲哚乙酸或 500倍的磷酸二氢钾溶液浸种 12 h。

切片须在露地苗床中育苗，苗床的制备与一般蔬菜苗床制备相同。在苗床栽植的行距为 10 cm，株距为 5～7 cm，每亩　1亩 $=\frac{10\ 000}{15}\ m^2$ 可育 8～10万片。育苗时间长短与每蔸所切片数有关，每蔸切 2～4片的，需培育 30～50 d。所切片数越多，长出幼苗越纤细，需培育时间越长。

⑶ 花薹腋芽繁殖

花薹腋芽繁殖是利用黄花菜花薹的分枝节上苞片中的腋芽进行繁殖。其具体做法是：选择生长健壮，无病害，青绿色的黄花菜花薹，在其腋芽下部 1.5 cm处用快刀斜切下，在上部离腋芽 2～3 cm处用剪刀剪平，截下的短枝基部用 2×10^{-5}的吲哚乙酸或萘乙酸浸 24 h，然后将浸过的短枝插在苗床或营养钵中。插后几天，花薹短枝会逐渐干缩，但仍保持绿色，腋芽则逐渐伸长，并长出新叶，地下部分则长出新根，经 30 d左右，能长出 3～4片叶，形成一新的植株。第二年春季可移栽大田，由于腋芽上一般有 1～3个小芽，因此，长出的幼苗往往分蘖丛生，可再进行分株繁殖。

三、作业思考题

1. 根据本地区无性繁殖植物现在种类及分布情况，通过查阅资料和调查了解，写出 1份 2～3种无性繁殖方法的报告。

2. 无性繁殖个体间性状应该很相似，但在繁种田里常常看到植株个体间出现或大或小的性状差异，特别是数量性状的差异更大些，是什么原因呢？

3. 你认为防止无性繁殖植物种性退化的有效方法是什么？

4. 你在对无性繁殖系进行选择时，遇到了什么难题，你打算怎样解决？

（潘敏）

实验 62　植物原种生产技术

原种指育种单位（个人）育成，经过审定合格的新品种与推广品种经过提纯复壮后均达到原种质量标准的种子。原种一般应具备的标准是：

⑴ 性状典型、一致

即要求主要特征特性符合原品种的典型性状，株间整齐一致，纯度高。

⑵ 生长势、抗逆性强

与原来品种比较，由原种种子生长的植株，其生长势、抗逆性和生产力等方面不降低，或略有提高。自交系原种的生长势和生产力要与原系相似，杂交亲本原种的配合力要保持原来水平或略有提高。

⑶ 种子品质好

子粒发育好，成熟充分，饱满一致，发芽率高，净度也高。

原种生产是一项科学性和技术性很强的工作，必须有一套完整的生产、供种过程。原种生产既是一个原种选择、鉴定和提高品质的过程，也是原种量的增殖过程，它在不同的生产阶段具有不同的特点和要求，但同时又有一定的连续性。这就决定了原种要按一定的程序生产、供种。

原种的生产方法主要有改良混合选择法和单系选择法。自交、常异交和无性繁殖作物普遍采用“单株（穗）选择，分系比较（一二次），混系繁殖”的二圃制或三圃制原种生产方法。其中，只进行一次分系比较的称为二圃制原种生产方法。与二圃制不同的是，三圃制多个株系圃，多一次分系比较，多一次后代鉴定，更有利于消除环境变异，确实选到遗传性优良的株系，再混系繁殖，而且株系圃还能测产。单系选择法其基本程序是单株选择，分系比较，优系繁殖。与改良混合选择法不同的是分系比较后，改良混合选择法将当选多个株系混合繁殖，而单系选择法只选最好的一个系繁殖成原种，也称为“一株（穗）传”原种生产法。此法生产的原种数量少，还会引起遗传漂变。

实验目的是学习掌握原种的生产程序和注意事项，掌握几种植物的原种生产方法。

一、试材及用具

1. 试材

黄瓜、番茄、菠菜（或大白菜、水稻及玉米自交系等的种子）。

2. 用具

整地用具、铅笔、纸牌、纸袋及称量用具等。

二、方法步骤

本实验以黄瓜、番茄和菠菜的原种生产为例。

（一）黄瓜原种的生产方法

黄瓜为雌雄同株的异花授粉作物，原种生产可采用单株选择，分系比较，系内混合授粉，混合繁殖的方法。

1. 选择单株

⑴ 选择

在原种田或纯度较高的种子田中进行。选择侧重以下两个方面：

① 植株

注意开花结果习性，第一雌花着生部位及植株分枝习性。

② 果实

注意瓜条形状、大小、色泽及其他特征。

选择分 4次，第一次在雌花开放前进行初选，选择雌花节位低，瓜码密，具有原品种特性特征的单株标记为授粉株；第二次在根瓜商品成熟期，选瓜把短，果实发育快，已行人工授粉的单果；第三次在种瓜成熟期，根据种瓜色泽、网纹、瓜形及抗病性特征决选株果；第四次在拉秧期对决选的已采种果的植株进行最后一次单株生产力、抗病性、抗热（寒）性的鉴定。

⑵ 授粉

将第一次初选单果的花进行人工授粉。

⑶ 收种

人工授粉的单果，经田间第二、三次两次选择，将决选果分别采收，分别编号，分别保存。

2. 株行圃

每单果至少种植 30株，要有固定专人观察记载第一雌花节位、开花期植株分枝习性、叶色、叶形、果实形状、大小、色泽、表面刺瘤及抗病性等。边观察，边鉴定，边淘汰。

3. 株系圃

每个株行种子种植一个小区，用原种种子作对照，田间观察记载项目同株行圃，每个株系要取一行计产，产量超过对照 5% ～30% 的为决选株系，其种子可混合保存作为下一年原种圃用种。

4. 原种圃

进一步鉴定，并扩大繁殖，在种瓜成熟期，根据本品种的性状选择一次，将选出的优良种瓜，混合采种作原种繁殖用。

（二）番茄原种生产技术

番茄为自花授粉作物，也可采用单株选择，分系比较，混系繁殖法。

1. 选择单株

选择具有典型特征特性的植株，注意丰产性、抗逆性、一致性，其单株来源也应在原种圃或纯度较高的种子田中选择，决选株数每亩　1亩 $=\frac{10\ 000}{15}\ m^2$　30株（初选 60株），选择应侧重以下 3方面：

⑴ 类型（有限、无限）和分枝习性。

⑵ 注意花序类型、第一花序的着生部位、每个花序的间隔叶数。

⑶ 果实形状、大小、色泽、每穗果实数。

选择方法为分 4次进行：

⑴ 第一次在苗期根据植株叶形、叶色。

⑵ 在田间根据植株叶形、花序、未熟果的果形进行选择。

⑶ 第三次在果实采收时，根据果形、果实大小选择，并对单果、纵横径、果肉厚薄、心室数、

果实充实度进行鉴定。

⑷ 在拉秧期对单株生产力及抗性进行最后一次鉴定选择。

2. 株行圃

鉴定当选单株后代，选出优良株行，得到用于株系圃的种子，观察记载株型、叶形、叶色、花序类型、开花期、果实形状、大小、颜色及早期产量。

3. 株系圃

每个株行的种子种植一小区，每 10 个株系设一对照，观察项目同株行圃，收获时要统计产量，产量超过对照 10% ～30% 的为决选株系，当选各株系种子混合贮藏，作为下年原种圃播种用，产量超过对照 30% 以上的株系，留作下年单独繁殖，室内考种同上。

4. 原种圃

合理适当稀植，保证高肥足水，田间去杂、去劣，混收。

㈢ 菠菜的原种生产技术

菠菜植株性型复杂，且为风媒传粉，为品种保纯和防止退化，搞好原种生产尤为重要。

1. 单株选择及比较

选种田应于秋季播种，冬前培育壮苗，加强越冬管理，第二年返青后至种株收获前分期多次进行选择。

单株选择的具体做法是：种株返青后，选越冬性好的植株作标记，在开花前鉴别性型，从中选出雌雄同株异花和雌雄同花的两性株后，用硫酸纸或羊皮纸将中选株套好、固定，开花时人工单株自交。终花后将纸袋摘除，并挂牌。为便于收获时查找和防止倒伏，在除袋时最好在中选植株旁插杆。待种子成熟后各单株分别采收种子，秋季分别播种，每二年春季继续选株自交，至纯度和株型符合要求后，系内混合留种。

2. 株系比较

将优良株系秋播，第二年返青后进一步鉴定比较和选择淘汰。保留雌性株和雌雄同株比例大，经济性状好的株系，在中选株系内再进一步淘汰杂株、劣株和绝对雄株。选择淘汰最好分 3 次进行，第一次在种株返青后结合间苗拔除不符合要求的植株，保留越冬性好，植株生长健壮，叶片大小和形状符合原品种性状的植株。第二次在抽薹开花前，拔除抽薹早，叶片小的绝对雄株，保留长势旺，抽薹晚，叶片肥大的植株。第三次在雌株和两性株开花前，除保留一部分营养雄株作授粉株外，把其余的雄株、劣株全部拔除，每平方米保留 1～2株营养雄株即可，种株成熟后采收、脱粒。

菠菜在株系比较阶段，主要是采取上述的分期淘汰的方法进行比较鉴定和采种。因此，为了能确切地选出优良株系，最好结合鉴定将株系内的植株数分次统计，如越冬前、返青后、抽薹后、开花前、种株收获或脱粒时，保留株数比率大的，一般来说，是性状较好，绝对雄株少的株系。

3. 原种比较

将决选株系混合的种子于秋季播种，第二年加强田间管理，严格去杂、去劣，并进一步鉴定其典型性、一致性和丰产性，及时收获、脱粒，所得种子即为原种。

㈣ 原种生产注意事项

1. 圃地的选择与隔离

原种生产的各圃都要选择旱涝保收，土壤肥力均匀一致，阳光充足，排灌方便，杂草少，禽畜

和鸟雀为害少的田块。南方的老病田、低产田，北方的涝洼地、山坡地、风沙地和盐碱地不能作为原种生产田。

原种生产要在隔离条件下进行，时间隔离只在一年多熟制地区有效，如在夏玉米地区可春播生产原种，但在一季春玉米地区时间隔离就行不通。空间隔离最常用，最有效，隔离距离应视植物种类而定。

2. 栽培技术

优良品种的种性在一定栽培条件下才能表现出来，原种生产应实行良种良法。

3. 种子收藏

要适时收获，贮藏时要严格控制种子含水量。

4. 严防混杂和错乱

原种生产程序多，时间长，利用三系制种的植物种子种类更多，稍一不慎就会发生错乱和混杂，例如，不育系繁殖和不育系制种的种子根本不能从外形上区分。故田间种植位置，室内的容器、装具存放位置都要严格作出标记，甚至同时设两个标记。

5. 三圃面积比例

这与单株选择、株行圃、株系圃当选比例，栽培管理，施肥水平，以及原种圃采取的繁殖措施等密切相关，对品种典型性掌握准确，淘汰比例小，栽培管理和施肥水平高，繁殖倍数高，三圃面积逐步加大的比例就大，反之就小。

三、作业思考题

1. 按指定品种，将原种生产过程中单株选择时入选株编号，列表记载入选株的基本性状及特点。

2. 每人写出 1份指定植物原种生产的田间管理方案。

（杨建平）

第九章　植物品种鉴别与种子质量监控技术

实验 63　植物种和品种的鉴别

学习并掌握各植物不同生育期的形态特征，并依据这些特征准确地鉴别主要的粮、棉、油、蔬菜、烟草、果树等作物种和品种，是做好植物科学工作的基础，对遗传育种工作更为重要。育种工作者认识品种，有利于对品种优劣的判断，从而正确地选择和选配亲本，合理制定选种标准，准确地鉴别变异；良种生产者认识品种，有利于种性保持和防止混杂退化，提高品种纯度。

本实验通过对主要作物种和品种鉴别的介绍并选择 1或几种植物进行观察、描述、记载，在认识不同植物形态特征基础上学习种和品种鉴别的方法。

一、试材及用具

1. 试材

小麦、水稻、玉米、大豆、棉花、烟草、大白菜及果树等植物主要种、变（亚）种和优良品种的植株、果穗（果实）、种子等的样品或标本。

2. 用具

直尺、镊子、刀片、培养皿、滤纸及放大镜等。

3. 试剂

⑴ 5% NaOH 溶液。

⑵ 碘试剂

0.2 g+2 g KI 研磨后溶于 100 mL 水中。

二、内容说明

Ⅰ　小　　麦

（一）小麦种的鉴定

小麦种（Trticum aestivum L.）属于禾本科（Gramineae）的禾亚科（Agrostidoideae）早熟禾系（Poatae）小麦族（Triticinae）小麦亚族（Triticinae）小麦属（Triticum）。关于小麦属内的分类，迄今尚未形成完整统一的意见，先后采用了 3种分类方法：

① 植物学分类

是根据形态特征，主要是穗部特征，分为二十多个种。

② 细胞学分类

是根据染色体的倍性，把小麦分为 3个系统，即一粒系、二粒系和多粒系（见表 9－1）。

表 9－1 主要小麦种的分类及学名

系 / 群	一粒系 (2n=14)	二粒系 (2n=28)	普通系 (2n=42)
野生种	野生一粒小麦 T. boeoticum Boiss	野生二粒小麦 T. dicoccoides Kom	
栽培的裸粒小麦		硬粒小麦 T. durum Desf 圆锥小麦 T. turgidum L. 波兰小麦 T. polonicum L. 波斯小麦 T. persicum Vav.	普通小麦 T. aestivum L. 密穗小麦 T. compactum 印度圆粒小麦 T. sphaeroccum Perc.
栽培的带壳小麦	一粒小麦 T. monococcum L.	二粒小麦 T. dicoccum Schum Schubl 提莫菲维小麦 T. timopheevii Zhuk.	斯卑尔脱小麦 T. spelta L. 马卡小麦 T. macha Dek et Men.

③ 遗传学分类

根据染色体组的异同，分为 5个种，即一粒小麦 (二倍体)、圆锥小麦 (四倍体)、提莫菲维小麦 (四倍体)、茹可夫斯基小麦 (六倍体)和普通小麦 (六倍体)。

以遗传学分类方法较为完善，其分类系统逐渐符合客观的遗传进化规律。但至今人们沿用较多的是植物学分类体系，故本实验主要熟悉该分类方法 (见表 9－1)。

小麦种主要根据下列穗部特征进行分类：

1. 穗轴脆韧性

① 穗轴易折断。

② 穗轴不易折断。

2. 茎秆穗下节间充实情况

① 全部中空。

② 上部充实。

3. 壳粒分离性

① 裸粒。

② 带壳。

4. 护颖性状

(1) 护颖性质

① 膜质 (柔软)。

② 草质 (普通)。

(2) 护颖与外颖相比

① 较短。

② 等长。

⑶ 护颖形状

龙骨突起情况，顶齿有无、长短等。

5. 穗部形态

穗长与穗宽之比、穗正面与侧面之比、穗紧密或松散。

6. 小穗

小穗着生于穗轴的角度、小穗结实数。

7. 子粒

子粒形状、质地、丛毛等。

（二）普通小麦变种的鉴定

普通小麦的经济价值最高，分布范围最广，种植面积最大。我国种植的小麦，96%以上都是普通小麦，其品种类型丰富多样，是小麦品种资源的基础。根据金善宝先生的分类，我国普通小麦分为通常类、圆颖多花类及拟密穗类，共有 101个变种（参见中国普通小麦主要变种分类检索表）。普通小麦的变种分类一般根据芒的有无、穗色、颖壳茸毛的有无、粒色等 4个性状，也有少数变种还需用芒色来鉴定。

1. 芒有无

无芒、有芒、曲芒。

2. 芒色

芒色分为红色、白色和黑色。白色穗的芒通常也是白色，红色穗的芒通常也是红色，但在白、红、黑色穗上有时也见到黑色的芒。

3. 颖壳颜色

白色、红色、蓝灰色。

4. 颖壳茸毛

无毛、有毛。

5. 粒色

纯白色到淡黄色的为白色，玫瑰色、淡褐色及红褐色的为红色。若仍有怀疑，则将种子浸于5%的氢氧化钠溶液中 15～20 min（或把种子放于开水中煮 15～20 min）。如此，白粒仍为白色或淡黄色，而红粒则加深为红褐色。

（三）小麦品种的鉴定

小麦品种一般根据下列生物学特性和形态特征来鉴定。

1. 生育期、冬春性、光温反应及幼苗生长习性等特性。

2. 株高、株型，穗形、穗色、小穗密度，芒的有无及芒色，护颖形状及颖肩、颖嘴、颖脊，子粒大小、形状、粒色、质地、腹沟、茸毛等特征。

表 9－2 小麦属主要种检索表

一、穗轴较易折断，带有小穗节片，子粒包于壳内，不易分离

（一）穗窄，每小穗一芒二花，一朵花结实，成熟时内颖纵裂为二，龙骨突起，护颖有侧齿…… 一粒小麦

（二）每小穗有二芒三花，二朵花结实，成熟时内颖不裂开

1. 穗侧面较正面宽，折断时节片连于小穗下部，护颖顶端较圆，常有锐齿

(1) 穗较宽且长，密度中等，护颖有锐齿，龙骨突起，穗下茎秆常充实 …… 二粒小麦
(2) 穗宽而短，护颖龙骨不明显，有近等边三角形齿，直或向后曲 …… 提莫菲维小麦
2. 穗横切面圆或椭圆形，折断时节片在小穗腹面，护颖圆或披针
(1) 穗疏长，横切面圆或方，护颖具短而钝的顶齿 …… 斯卑尔脱小麦
(2) 穗密，侧面较正面宽 0.5～1.0倍，护颖具尖锐顶齿 …… 马卡小麦
二、穗轴不易折断，壳粒易分离
(一) 护颖膜质，与外颖等长，每小穗基部一花护颖为外颖的一半，穗下茎秆充实 …… 波兰小麦
(二) 护颖草质，较外颖短，内颖稍短于外颖
1. 护颖龙骨突起，直达基部，芒长于穗，平行或接近于平行，穗下茎秆充实
(1) 穗密，正方形或侧面较宽，护颖比外颖稍短，粒长脊高，丛毛少，角质 …… 硬粒小麦
(2) 穗密或疏，正方形，护颖膨胀，较外颖短 1/3，子粒近圆，大多为粉质 …… 圆锥小麦
2. 护颖龙骨突起，上部明显，中部成脉状，基部消失，有齿或无齿
(1) 穗有长而软的芒，平行，护颖顶齿尖锐，长而细，或芒状，穗侧面平直，子粒长大 …… 波斯小麦
(2) 穗有芒或无芒，向外开展，护颖顶齿长，穗侧面平直，子粒大
① 穗短而密，长度不超过宽度 3倍，子粒长度比例小，小穗与穗轴几乎成直角 …… 密穗小麦
② 穗长而疏，类型多，子粒粉质或角质 …… 普通小麦
③ 穗较小，密生，子粒较小，呈圆球形 …… 印度圆粒小麦

Ⅱ　玉　　米

玉米属内只有玉米 (*Zea mays* L.)一个种，因此，玉米没有种间杂交。

根据玉米子粒上稃壳的有无、子粒形状、胚乳的性质与成分，玉米分为硬粒型、马齿型、半马齿型、糯质型、粉质型、爆裂型、甜质型、甜粉型和有稃型 9个类型 (亚种)。这些亚种之间除了在子粒性状上有显著的差异外，在植株性状上也有不同程度的差别，各自具有独特的优良种质，都是玉米育种优良的原始材料。每个玉米育种工作者，必须熟悉掌握各个亚种的特点，才能有针对性地加以利用 (各个玉米亚种的特性特征见表 9－3)。

表 9－3　玉米亚种检索表

(根据子粒性状和稃壳的有无)

1. 子粒包在稃壳内 …… 有稃型
(*Zea mays* L. *tunicata* Sturt)

1. 子粒外露无稃壳包住
2. 子粒加热易爆裂，子粒小，果皮坚厚，全部为角质胚乳 …… 爆裂型
(*Zea mays* L. *everta* Sturt)
2. 子粒爆裂性差或无爆裂性
3. 子粒无角质胚乳，全为粉质胚乳，顶部不凹陷 …… 粉质型
(*Zea mays* L. *amylacea* Sturt)
3. 子粒有角质胚乳
4. 干后皱缩，含糖量高
4_1. 子粒几乎全为角质透明胚乳 …… 甜质型
(*Zea mays* L. *Saccharata* Sturt)
4_2. 子粒上部为角质胚乳下部为粉质胚乳 …… 甜粉型
(*Zea mays amyleo* L. *Saccharata* Sturt)

5. 胚乳由 78%支链淀粉、22%直链淀粉组成

5_1. 子粒周围为角质胚乳，中间至粒顶为粉质胚乳，干后顶部凹陷

…… 马齿型

(*Zea mays* L. *indentata* Sturt)

5_2. 子粒四周及顶部为角质胚乳，中间有少量粉质胚乳，干后顶部不凹陷

…… 硬粒型

(*Zea mays* L. *indentata* Sturt)

5_3. 胚乳全部为支链淀粉，角质与粉质的层次不分明，子粒呈不透明的蜡状

…… 糯质型

(*Zea mays* L. *ceratina kulesh*)

玉米的品种、杂交种和自交系的种类很多，每个都具有各自的特性特征。在这些特性特征中，有些在遗传上比较稳定，有些则不稳定。因此，在识别品种、杂交种或自交系时，必须抓住各个品种（杂交种、自交系）的几个特殊而又比较稳定的性状进行鉴定（参见实验 69）。

Ⅲ 水　　稻

水稻的学名为 *Oryza sativa* L.，属禾本科（Gramineae）稻属（*Oryza*）。

水稻品种分类的标准很多，但通常是根据少数特征特性来加以区别。一般水稻分类主要有3种方法：

1. 依据对生态条件的适应性分类

依据地理分布的差异，水稻分为粳亚种和籼亚种，粳亚种分布在高纬度的温带地区，籼亚种分布于低纬度的热带、亚热带地区，它们之间杂交所得 F_1 结实率一般 50%以下。两亚种在血清反应和碳酸反应上均有差异，在形态、生理及栽培特性上也不同。若依生长期长短及对日照反应的不同，水稻又可分为单季稻、双季稻或早熟、中熟、晚熟等不同类型。水稻也可依对不同水分条件的适应性分为水稻型和陆稻型。

2. 依据米的淀粉性质不同分类

依据稻米中支链淀粉和直链淀粉的比例，分为黏和糯两个变种。

3. 依据植物学和生物学特性分类

依据稻植株、叶、穗、谷粒、米粒的形状、大小、颜色等植物学特性和耐旱、耐寒、抗病、抗虫等生物学特性，可将水稻分为多种类型。

表 9－4　中国栽培稻种检索表

亚种 1：籼稻。粒形狭而扁平，颖毛短而少

群 1. 晚季稻：大田栽培时，通过光照阶段期间的日照在 14 h以下

型 1. 水稻：在水田栽培

变种 1. 黏稻：米黏性，米色透明 …… 第一变种（品种：广东齐眉）

变种 2. 糯稻：米糯性，米色乳白 …… 第二变种（品种：广东小糯）

型 2. 陆稻：在旱地栽培

变种 1. 黏稻：米黏性，米色透明 …… 第三变种（品种：广东白米秋真仔）

变种 2. 糯稻：米糯性，米色乳白 …… 第四变种（品种）

群 2. 早、中季稻：大田栽培时，通过光照阶段期间不受日照长短的限制

型 1. 水稻:在水田栽培
变种 1. 黏稻:米黏性,米色透明 …… 第五变种 (品种:江西南特号)
变种 2. 糯稻:米糯性,米色乳白 …… 第六变种 (品种:广东省细糯)
型 2. 陆稻:在旱地栽培
变种 1. 黏稻:米黏性,米色透明 …… 第七变种 (品种:广东坡禾)
变种 2. 糯稻:米糯性,米色乳白 …… 第八变种 (品种:仁化陆稻)
亚种 2:粳稻。粒形宽而厚,颖毛长而密
群 1. 晚季稻:大田栽培时,通过光照阶段期间的日照时间在 14 h以下
型 1. 水稻:在水田栽培
变种 1. 黏稻:米黏性,米色透明 …… 第九变种 (品种:江苏老来青)
变种 2. 糯稻:米糯性,米色乳白 …… 第十变种 (品种:广东东圃糯)
型 2. 陆稻:在旱地栽培
变种 1. 黏稻:米黏性,米色透明 …… 第十一变种 (品种:广东山禾粳)
变种 2. 糯稻:米糯性,米色乳白 …… 第十二变种 (品种:广东兰糯)
群 2. 早、中季稻:大田栽培时,通过光照阶段期间不受日照长短的限制
型 1. 水稻:在水田栽培
变种 1. 黏稻:米黏性,米色透明 …… 第十三变种 (品种:江苏有芒早粳)
变种 2. 糯稻:米糯性,米色乳白 …… 第十四变种 (品种:广东红头糯)
型 2. 陆稻:在旱地栽培
变种 1. 黏稻:米黏性,米色透明 …… 第十五变种 (品种:辽宁安东陆稻)
变种 2. 糯稻:米糯性,米色乳白色 …… 第十六变种 (品种:广东英德大糯)
注:上述分类根据丁颖主编《中国稻作学》上的方法

Ⅳ 大 豆

大豆属于豆科蝶形花亚科大豆属大豆亚属,一般认为,亚属内有两个种,即野生大豆 (Glycine soja Sieb and Zucc)和栽培大豆 [Lycine max (L.) Merrill]。两个种都是二倍体 (2n=40)且亲缘关系较近,互相杂交容易成功。

(一) 关于大豆的分类,目前存在较多的看法,没有统一系统的分类方法。我国较广泛采用的是按其单一的生态特点,将大豆分为若干个生态类型。

1. 按生育期长短划分大豆生育期的长短,是由原产地生长季节的日照长短和温度高低所决定的,原产于某一特定地区的不同大豆品种,其生育期是相对稳定的。因此,按照原产地生产上播种期条件下的生育期天数,可将大豆分为:

(1) 极早熟型

对短光照反应很微弱,多数原产于黑龙江克山以北地区。

(2) 早熟型

对短光照反应较弱,多数原产于黑龙江克山以南及吉林北部地区。

(3) 中熟型

对短光照反应较敏感,主要分布在吉林中部以南到淮河沿岸及陕南以北地区。

(4) 晚熟型

对短光照反应敏感,原产于长江流域。

⑸ 极晚熟型

对短光照反应敏感,原产于长江以南诸省。

黄淮平原夏大豆主要有早熟型 (生育期 100 d以下)、中熟型 (生育期 101～110 d)、晚熟型 (111～120 d)和极晚熟型 (120 d以上)。

2. 按种皮颜色的不同,可将大豆分为黄大豆、青大豆、褐大豆 (茶豆)、黑大豆和双色大豆 5种类型。

3. 按子粒大小,可将大豆分为小粒种、中粒种、大粒种和特大粒种 4种类型。百粒重在 12 g以下的为小粒种,12～19.9 g的为中粒种,20～29.9 g为大粒种,30 g以上为特大粒种。

这样按照生育期、种皮颜色及子粒大小可将大豆分成许多类型群,在此基础上,还应根据其结荚习性、茸毛颜色和花色等性状进一步进行识别。

(二) 大豆是一种"多型性"作物,种内的生态类型较多,同时,每一个生态类型中又包括若干不同品种,对类型内品种间的识别主要是依据其结荚习性、花色、茸毛特性等性状。

1. 株型

包括分枝数、分枝角度、株高、茎粗等。

2. 生长习性

分直立、半蔓、蔓性 3种,其中蔓性和半蔓性的分枝有缠绕现象。

3. 结荚习性

分无限结荚、有限结荚和亚有限结荚。

4. 花色

分紫、淡紫、白 3种。

5. 果荚

包括果荚颜色、大小、形状,茸毛的有无、颜色。

6. 粒

粒形分圆、椭圆、扁椭圆等,粒色分黄豆、青豆、黑豆、褐豆、双色豆等,种皮上有无光泽。

7. 脐色

分白、黄、红、褐、兰、黑等。

8. 子叶

分黄色、绿色。

Ⅴ 棉 花

(一) 四大栽培种的识别、鉴定:

棉花属于锦葵科 (Malvaceae)的棉属 (Gossypium)。根据近几年分类学家的意见,认为共有39个种,在我国和世界上先后为人们栽培利用过的有 4个种,即陆地棉、海岛棉、亚洲棉和非洲棉。其主要形态特征如下:

1. 陆地棉 (G. hirsutim L. 2n=4X=52)

原产中美洲墨西哥一带高原地区。植株下部营养枝较少或没有,嫩枝嫩叶多被茸毛。叶大、掌状、3～5裂,裂口为 1/2或更浅,裂片呈宽三角形,锐尖基部不收缩,裂口处稍有折叠。苞叶长大于宽,心脏形,通常具有 7～12个长而尖的齿,齿长超过宽的 3倍以上。花大,花冠开展也大,

花瓣乳白色，通常没有红斑。铃大，卵圆形或圆形，表面光滑，有不明显的油腺，4～5室，很少有 3室的，种子上被有短绒和较细长的纤维。

2. 海岛棉 (G. barbadense L. 2n＝4X＝52)

原产南美洲，后传入北美洲的东南沿海岛屿种植，称海岛棉。植株下部有少数或较多的营养枝。嫩枝及嫩叶从完全光滑到被有茸毛。叶片 3～5裂，裂口长度约 2/3，裂片长，渐尖，基部稍有收缩，裂口处通常互相折叠。苞叶长宽近乎相等，心脏形，边缘有 10～15个锐尖长齿，齿的长度超过宽的 3倍以上。花冠长于苞叶，为硫磺色，基部有红斑，花冠开展度不大。铃较小，通常为3室，有时也有 4室的，基部宽而顶部尖，有时有较明显的铃肩，铃面粗糙，有明显的凹点及油腺。纤维细长而有丝光。种子一般为光籽，有的有端毛 (一端或两端均有)。

3. 亚洲棉 (G. arboreum L. 2n＝2X＝26)

原产印度，后传入我国，又称中棉。植株下部营养枝较少或没有，嫩枝及嫩叶上被有或多或少的茸毛。叶片 5～7裂，叶片裂口长度为 1/3到 4/5，在裂口处常附生有小裂片，裂片矛头形，少数鸡脚叶品种呈柳条叶形，较尖，基部稍有收缩。苞叶紧围于蕾及铃的外部，略成三角形，长大于宽，全缘，或近顶部有 3～4个粗齿。花瓣黄色，花内基部常有红斑，个别品种也有红色或白色花瓣的。铃圆锥形，下垂，铃面有很多凹点，在凹点内有明显的油腺。棉铃通常为 3室，4室的很少。种子外被有短绒及纤维，亦有只生纤维而没有短绒的。纤维粗而短。

4. 非洲棉 (G. herbaceum L. 2n＝2X＝26)

原产非洲，因植株较小，又称草棉。植株下部只有少数营养枝或没有营养枝。嫩枝及嫩叶被有稀毛，光滑的很少。叶通常宽大于长，有 3～5个 (或至 7个)裂片，裂口长 1/2或小于 1/2。裂片卵形、微圆至圆形，仅在基部稍有收缩，裂口处没有附生裂片。苞叶心脏形或宽三角形，宽大于长，边缘有 6～8个宽三角形的锯齿，在蕾的基部向外反卷，亦有不反卷的，花瓣黄色，内有红斑。铃极小，圆形，肩部明显，铃面光滑，或有极浅的凹点，3或 4室，成熟时开裂很小。种子上着生纤维及短绒，只生纤维而不生短绒的很少，纤维细而短。

(二) 陆地棉不同类型品种系的观察

陆地棉是当前世界和我国主要的栽培种，又有各种类型品种系。有的有某些特殊性状，如红叶、鸡脚叶、芽黄、无蜜腺、窄卷苞叶等，在育种上这些性状均可利用。棉花的不同品种 (系)在形态上也有很大差别，要识别和区分品种 (系)，主要可参考下列项目：

1. 株型 (株式)

根据果枝长短、强弱、紧凑和松散差异。如果按果枝和叶枝的长短与分布，棉花的株型可分为：

(1) 塔型

上部果枝短，向下渐长，下部最长，叶枝少，为早熟丰产型。

(2) 筒型

上、中、下 3部果枝近于等长，叶枝少，成熟早，一般短果枝品种多属于此种形式。

(3) 矮丛型

植株基部有多数强大的叶枝，高度与主茎相近，中部果枝也较少，此种株型晚熟，产量低，栽培品种少见。

如果按果枝上果节的长短，棉花的株型可分为：

(1) 有限果枝型

只有一个果节,果枝顶端着生几个棉铃。

(2) 无限果枝型

具有数个较长的果节,按其节间长短可分为:

Ⅰ型 (紧凑型):果枝节间长 2～5 cm;

Ⅱ型 (较紧凑型):果枝节间长 5～10 cm;

Ⅲ型 (较松散型):果枝节间长 10～15 cm;

Ⅳ型 (松散型):果枝节间长 15 cm 以上。

2. 茎

(1) 茎色

有青、红两种,红茎中有深紫红、红、浅红的差别。

(2) 油腺

棉花茎上都散布着暗色或浓棕色的油腺,油腺形状及大小、多少随棉种和品种而异。

(3) 茸毛

不同品种茸毛的多少和长短有差别。

3. 叶片

(1) 叶片大小

测量叶长及叶宽,通常用叶指数 (即叶长 /叶宽)来表示。

叶长:叶片基部至中裂片顶端的距离。

叶宽:中裂片两侧最大的两裂片顶端的距离。

取主茎上第四、五枝节上生长正常的叶片测量,每株两片,每个品种 10株,共 20片,求平均。

(2) 叶形

用文字描述。

裂缺较深:裂口深达叶长的 1/2以上者。

裂缺较浅:裂口不及叶长的 1/2者。

(注:裂缺深度系指中裂片之长减去叶基部至第一裂口之差距离;中裂片之宽指中裂片的最大宽度。)

4. 花和苞叶

花和苞叶的状况。

5. 铃

铃的形状、大小和铃室数、开铃情况等。

6. 种子和纤维

种子和纤维的状况也可作为区别品种的参考。

Ⅵ 甘 薯

甘薯又名红薯、地瓜、红苕、山芋等,学名 Ipomoea batatas Lan.,英文名 sweet potato,属于旋花科,为无性繁殖作物。在我国北方一般不能开花,故品种的鉴别较其他作物有些困难,主要是依据品种的形态特征或生物学特性的某些差异进行。有些品种间的性状差异明显,比较容易区分,而有的品种间仅在一、二个性状上表现不同 (甚至不是主要性状)。因此,在品种鉴定时,往往某

个或某些性状具有鉴别的特殊意义。

甘薯品种的识别常需通过多次的鉴定分析。收获前多种农艺性状表现最为明显，是进行识别的关键时期。甘薯品种鉴别分田间鉴定和室内鉴定两个阶段。田间鉴定要在早霜前，甘薯还正常生长的时期进行，可根据不同品种叶部和茎部的特征、特性进行鉴定识别。收获后，在室内着重考察块根性状和经济性状等。

（一）叶部性状

1. 顶叶色

观察顶部 2～3片未展开叶，分紫、褐、绿和绿叶紫边等颜色。

2. 叶色

有浅绿、绿、浓绿、紫绿等色（以最长蔓顶叶下 10节为准，下同）。

3. 叶脉色

以反面的叶脉颜色为准。分深红或紫红、淡红或淡紫和绿色 3种。叶脉色还存在全部脉、主脉和部分主脉的差异。

4. 叶基色

叶片基部的颜色。分紫、褐、红、绿等色。

5. 叶柄色

大多数为浅绿色，有些品种叶柄基部或全部有花青素，一般分绿、绿带紫、紫等色。

6. 叶形

分三角形、肾形、掌形、心脏形等，在这些基本叶形基础上还有带齿状的。此外，按叶缘又可分为浅裂或深裂，单缺刻或多缺刻等。一般叶片裂口长度等于或超过主脉长度 1/2的为深裂，小于 1/2的为浅裂。植株不同部位的叶形，往往略有差异，但以大多数的基本叶形为准时，还是可以区别品种间差异的。

（二）茎部性状

1. 株型

根据蔓叶在空间的分布，分蔓生、半直立和直立 3种。

2. 茎色

茎色在很大程度上取决于光照等气象条件，但有些品种茎色变化较小，或与其他品种差异显著，因此这个特征也可用于鉴别品种。茎色一般分为紫、淡紫、绿、绿带紫 4种。

3. 茎茸毛

除全茎有茸毛以外，尚有茎下部或上部有茸毛的，及完全无茸毛或只在节上有茸毛的品种。茸毛的多少可以用多、中、少、无表示。

4. 茎长

在地上部生长盛期测定最长的蔓。根据生长于同一条件下的蔓长，可分为长蔓型（春薯蔓长 2.5 m以上，夏薯蔓 2 m以上）、中蔓型（春薯蔓长 1.5～2.5 m，夏薯蔓长 1～2 m）、短蔓型（春薯蔓长 1.5 m以下，夏薯蔓长 1m以下）。

5. 节间长度

是品种鉴别的可靠特征，一般蔓长节间亦长，从 10 cm至 20 cm不等。

6. 茎粗

主蔓顶叶下第 10节的茎粗,可分为粗蔓型 (>6 mm)、中蔓型 (4～6 mm)、细蔓型 (<4 mm)。

(三) 块根性状

1. 结薯部位

集中或不集中。

2. 薯形

因土壤及营养条件不同而异,分规则和不规则两大类。规则类又分正纺锤形 (最大直径 :长 = 1∶2～1∶4)、长纺锤形 (最大直径 :长 <1∶4)、圆形 (最大直径 :长 >1∶2)、球形 (似球体)、筒形 (顶部下 1 cm处,径下分 4等份,其 1/4, 2/4, 3/4处直径相等)。不规则类有坛状、块状、葫芦状等。

3. 皮色

薯皮有白、黄、红紫等色,随土壤状况略有变化。

4. 薯肉色

有白、黄、杏黄,橘红而带紫晕、紫斑等色,此性状稳定,是品种鉴别的主要特征。

Ⅶ 烟 草

烟草 (Nicotiana tabacum L.)英文名 tabacco,属于茄科 (Solanaceae)烟草属。烟草属内包括 66个种,其中绝大多数种是野生种,只有红花烟草和黄花烟草两个栽培种。红花烟草是我国最主要的栽培种,因此又称为普通烟草;黄花烟草栽培种植较少,仅在我国西北、东北部分省区栽培的晒烟中有一小部分利用。红花烟草和黄花烟草均原产于中、南美洲,且均为异源四倍体,其染色体组型是 SSTT,体细胞染色体数 2n=48。

(一) 红花烟草 (普通烟草)

是一年生草本植物,但在适宜条件下可以是多年生的,植株高大,株高一般为 100～300 cm。具腺毛,茎木质化,茎和主脉多呈绿色,有的呈乳白色。叶片大小相差悬殊,除香料烟较小外,一般长 30～60 cm,宽 15～30 cm,卵圆形至披针形,全缘或微波状叶缘,尖端卵状或尾状,叶基半包茎而成侧翼状,多数无叶柄,但也有具柄的,全株叶片有十几片至几十片。花长 3～5 cm,具短柄。花萼长圆形,裂片披针形。花冠漏斗状,外部具腺毛,喉部稍膨大,裂部颜色深于管部,除少数呈白色外,多数为粉红色至深红色。蒴果卵圆形至近球形。种子形状不规则,粒小,千粒重一般为 50～90 mg。

依据品种特性、栽培特点、调制方法及工业用途等,我国栽培的红花烟草又分为烤烟、晒烟、晾烟、白肋烟、雪茄烟和香料烟。

(二) 黄花烟草

为一年生或二至三年生草本植物,株高一般为 30～60 cm。叶片具柄,较红花烟草小而厚,叶色较深,卵圆形或心脏形,叶片边缘整齐,尖端钝。花较短,一般长 2.5 cm左右,花序较紧密。花萼裂片近三角形。花冠呈阔圆柱形,上部膨大,喉部收缩,裂片较短、圆形,花冠黄色或黄绿色。蒴果卵圆形至近球形。种子大小为红花烟草的 3倍左右,千粒重一般为 200 ～250 mg。黄花烟为晒烟。

Ⅷ 白 菜

白菜属十字花科 (Cruciferae)芸薹属 (Brassica),是我国,尤其北方地区重要的冬春蔬菜。白菜又分大白菜 (B. pekinensis Rupr.)和小白菜 (B. chinensis L.)。小白菜不结球,又称青菜,我国

南方栽培较多，北方亦有种植。

大白菜依其是否结球及结球性状，分散叶、半结球、花心和结球 4个变种，其中结球变种依结球的形状又可分为卵圆型、平头型和直筒型。4个变种及其生态型是结球大白菜的基本类型，它们相互杂交还产生了 5种次级类型：

⑴ 平头直筒型。

⑵ 平头卵圆型。

⑶ 圆筒型。

⑷ 花心直筒型。

⑸ 花心卵圆型。

大白菜按种植季节又分为春、夏、秋、冬型，按球叶特点还可分为叶数型、叶重型、中间型，按叶色分为青帮型、白帮型、青白帮型。

中国大白菜的栽培品种主要有：福山包头、胶县白菜、城阳青、唐王小根、旅大小根、冠县包头、洛阳包头、天津青麻叶、翻心白、大青口、小青口等。栽培的杂种一代主要有：

⑴ 合抱类型的山东 2，5号，鲁白 3，4，7号，青杂 5号，城杂 5号，青杂中半等。

⑵ 叠抱类型的鲁白 1，5，6，8，10号，山东 4，7号，豫白 3号，青杂 3，4号，城青 2号，郑杂 1号，亚蔬 1号，双青 156，新丰 2号，萼白 4号等。

⑶ 拧抱类型的北京 4，10，80，88，97，100，106，新 1号，北京小杂 56，65，晋杂 3号，夏阳，青半，缘言，农牛，碧玉，辽白 1号，青庆等。

从以上所述可以看出，大白菜品种鉴别最好的时期为结球期和结球收获期，鉴别性状主要为结球与否、结球的形状、叶球包合类型。除此外，还可依据以下性状鉴别：

1. 幼苗性状

包括子叶形状、大小、厚薄、颜色、茸毛多少、幼茎颜色等，真叶的形状、大小、叶缘、叶色、叶脉色、茸毛等。

2. 花的性状

包括花期、花的形状、大小，自交亲和指数等。

3. 植株（终花期）性状

包括株高、分枝开张度、枝干硬度、分枝多少等。

4. 角果性状

包括角果长短、粗细、成熟度、整齐度、疏密程度，果柄与茎的角度，裂荚性等。

5. 种子性状

包括种皮颜色、种子大小、种皮上网纹状况、种子脐部状况等。

十字花科芸薹属的蔬菜作物如油菜、甘蓝、芥菜、花椰菜及萝卜等，均可按照以上所述（结球性状除外）进行鉴别。

Ⅸ 果树品种的鉴别

对果树品种的描述和鉴别，就是对品种的树体、枝、芽、叶、花和果实等的形态特征进行观察、记载和比较鉴别，以品种的形态特征用作鉴别品种和进行分类的依据。

果实是果树栽培的目的产品，是品种选育的主要对象。不同果实性状的多样化更为突出。

因此，可以在很大程度上将果实作为鉴别品种差异的主要依据。

果树品种繁多，描述鉴定的项目和标准依树种而有所不同，主要包括：

（一）植株性状

如树形、树姿、树势、树干高度和粗度、分枝情况等。

（二）生物学特性

如生长与结果习性、物候期等。

（三）果实性状

1. 外观

如果实形状、重量、色泽、整齐度等。

2. 内质

如果肉色泽、肉质、汁液、风味、香气、可溶性固形物、含糖量、含酸量等。

3. 贮藏性

果实贮藏性的好坏。

（四）抗逆性

对不良环境的抵抗能力。指抗寒、抗旱、抗涝、抗风、抗病虫能力等。

现以梨［英文名 pear，属蔷薇科（Rosaceae）梨属（Pyrus）］为例介绍如下（见表 9－5）。

表 9－5　梨品种鉴别表

种类：　　品种：　　别名：　　编号：

植株概况		树龄：　　树高_____ m　冠径：东西_____ m，南北_____ m 树形：圆头　　圆锥　　；树姿：直立　　半开展　　开展 干粗：距地面 30 cm 处的粗度_____ cm；干高：地面至第一分枝高度_____ cm
生物学特性	生长、结果习性	1. 中心领导枝生长情况：强、中、弱 2. 骨干枝分枝角度：大、中、小 3. 侧枝（　　年生）长度_____ cm 4. 新梢：平均长度_____ cm；粗度_____ cm；节间平均长_____ cm 5. 萌芽力：　　成枝力： 6. 开始结果年龄：　　盛果期树龄： 7. 果枝类型：长果枝占_____%，中果枝占_____%，短果枝占_____%，腋花芽占_____% 坐果部位的分布：上、中、下、内、外，落果程度：多、中、少 8. 产量：高、中、低；单株平均产量（盛果期）_____ kg 单株最高产量_____ kg
	主要物候期	1. 萌芽期：（芽顶端鳞片松开、露出叶尖） 2. 开花期：（全树有 25% ～50% 的花开放） 3. 成熟期：（全树有 75% 的果实到达采收期） 4. 落叶期：（全树有 50% 的叶片脱落）
果实性状	外观	1. 果实大小：纵径_____ cm，横径_____ cm 2. 果实重量：平均果重_____ g 最大果重_____ g 3. 果实整齐度：差、较差、一般、较好、好 4. 果实形状：圆形、卵圆形、圆锥形、长圆形、瓢形 5. 果皮：① 底色：黄、绿、褐 ② 彩色：无、有（占果面_____%）

续表

果实性状	外观	③ 厚度:厚、中、薄 ④ 光滑度:光滑、一般、粗糙 ⑤ 附着物:有锈斑、全面锈色、蜡质厚薄、果粉多少 6. 果点:① 大小数量:大、中、小;多、中、少;显著、不显著 ② 形态:圆形、不正形、点形、圆柱形;平或凸 ③ 颜色:黄、锈色 ④ 分布:近萼端多、近梗端多、果面散生 7. 果梗:① 长度_____ cm;粗度:粗、中、细 ② 基部有无肉质:有、无 ③ 着生:直生、斜生 8. 梗洼:① 深广度:狭小、浅窄、中等、浅广、深广 ② 附着物:有锈、无锈;有沟纹、无沟纹 9. 萼片:① 存落:宿存、残存、脱落 ② 开闭:开张、半张展、闭萼 ③ 大小:大、中、小 10. 萼洼:① 深广度:狭小、浅窄、中等、浅广、深广 ② 附着物:有锈、无锈;有沟纹、无沟纹 11. 果心:① 大小:大、中、小 ② 位置:近萼端、中位,近梗端 ③ 形状:
	内质	1. 果肉色泽:乳白、黄白、淡绿 2. 肉质:粗、细;脆、松、软、硬;石细胞:大小_____多少_____ 3. 汁液:多、中、少 4. 风味:甜、酸、甜酸适度、微酸、味淡;有无涩味:有、无 5. 香气:无、微香、浓香 6. 固形物____%;含糖量____%;含酸量____%;维生素 C____mg/100 g鲜重 7. 品质:差、较差、中、良、优
	贮运性	
抗逆性及适应性		抗风力:_____,抗旱性:_____,抗涝性:_____,抗寒性:_____ 对自然条件和栽培管理的要求:_____
综合评价		

三、方法步骤

(一) 观察小麦或水稻的植株和穗粒,玉米 9大类型的植株和果穗,或大豆、棉花、烟草、大白菜、梨的植株、果实或种子,记录其主要特征,结合查对检索表,写出种、变 (亚)种的名称及学名,或所属类型、品种。

(二) 若从植株、果穗、种子形态特征上难以确定时,小麦可将子粒浸入 5% NaOH溶液 15～

20 min,以观察子粒颜色,水稻、玉米等可将子粒横切浸入碘试剂中以确定糯与非糯。

(三)若是鉴别同一类型作物的栽培品种,常因品种间性状太过类似而难以确定,此时可将种子解剖置解剖镜下观察形态结构的细小差异,如十字花科芸薹属种子的种皮网纹,烟草种皮上的花纹等。若仍无法确定且又必须作出鉴定结果时,可进行 DNA鉴定。

四、作业思考题

1. 将鉴别性状及结果列表。
2. 举例说明要识别一种植物的不同种和品种应着重掌握哪些特征?为什么?
3. 如何才能较好地掌握植物鉴别技术?

(高荣岐)

实验 64　植物品种田间纯度检验

植物品种纯度包括种子纯度和种苗纯度,是种子及种苗品质的重要指标,也是评定种苗等级的主要依据。品种纯度检验又分田间检验和室内检验,而田间检验不仅可及时测知种子繁殖田的品种纯度,而且可依据检验结果进行有效地控制。

田间检验以品种纯度为主,同时检验杂草、异作物、病虫感染率、生育情况等。

本实验旨在练习田间检验的方法,掌握田间检验的内容、依据、时期及田间取样方式,并顺便了解制种田情况。

一、试材及用具

1. 试材

小麦、玉米、棉花、白菜及向日葵等种子田或品种比较试验田。

2. 用具

米尺、放大镜及镊子等。

二、依据

不同品种由于其遗传组成不同,生长发育的不同时期品种之间在植株性状、穗部性状、果实性状等方面存在着差异,这些差异是进行田间纯度检验的依据。田间检验最好在性状表现最完全、最明显的花期、成熟期进行,异花授粉作物在穗花期增加 1～2次,蔬菜作物在商品部位成熟期增加 1次。在各类性状中,有的易受环境影响而发生变化,在利用这些性状时以单株为单位进行分析比以单穗为单位要准确。因此,在田间检验时,尽量以单株为单位进行。

三、方法步骤

(一)了解情况

了解被检验品种的特征、特性、隔离区,以及制种技术等。品种的特征特性可结合品种比较试验与其他品种加以区分。

（二）品种真实性鉴定

根据了解的品种特性，与待检种子田进行比较，确定是否为待检品种。若是，实验继续进行。

（三）划区设点

同一品种、同一来源、同一繁殖世代、同一栽培条件的相连地块可划分为一个检验区，但一个检验区的面积不能超过 500亩（1亩 $=\frac{10\ 000}{15}$ m^2）。在检验区内设点取样，各种作物设点的数目和每点的株数规定见表 9－6。

表 9－6　各种作物的取样点数和株（穗）数

作物种类	面积 亩	取样点数	每点最低株（穗）数
稻麦 粟黍（稷）	10以下 11～100 101～200 201～500	5 8 11 15	500
玉米、高粱 大豆、薯类 油菜、花生 棉花、黄麻、红麻 芝麻、亚麻 向日葵	10以下 11～100 101～200 201～500	5 8 11 15	200
蔬菜	5以下 6～15 15亩以上每增加 10亩增加一点	5 9～14	80～100

注：1.原种繁殖田和亲本繁殖田、杂交水稻制种田取样点数加倍。

2. 1亩 $=\frac{10\ 000}{15}$ m^2。

（四）取样

大的方形或长方形地块可采用对角线布点取样，小的方形或长方形可采用梅花式布点，不规则地块可采用棋盘式布点，对中耕作物可采用大垄取样法。点的分布应距地边 5 m以上。

（五）检验

在取样点上逐株鉴定，将本品种、异品种、异作物、杂草及感染病虫株数分别记载。杂交制种田还应记录父（母）本杂株数，母本散粉株数。并计算各种成分的百分率。

（六）填写检验结果单

在各检验时期，按以上步骤进行检验，将各点检验结果平均，填写检验结果单（1式 3份），并对制种田的质量提出建议和意见。检验结果单见表 9－7，表 9－8。

表 9－7　品种检验结果单　　字第　　号

繁种单位				
作　　物			品　　种	
繁种面积			隔离情况	
取样点数			取样总株（穗）数	
田间纯度检验	异作物 /%		病虫感染 /%	
	异品种 /%		品种纯度 /%	
	杂草 /%			
田间检验结果				
建议或意见				

检验单位：（盖章）　　年　　月　　日　　检验员

表 9－8　杂交种检验结果单　　字第　　号

繁种单位				
作　　物			组　　合	
制种面积			隔离情况	
取样点数			取样总株（穗）数	
田间检验	异作物 /%		病虫感染 /%	
	父本散粉杂株 /%		母本散粉杂株 /%	
	母本散粉株 /%		杂草 /%	
田间检验结果				
建议或意见				

检验单位：（盖章）　　年　　月　　日　　检验员

（七）结果计算

$$\text{品种纯度}=\frac{\text{本品种株（穗）数}}{\text{供检本作物总株（穗）数}}\times 100\%$$

$$\text{异品种比率}=\frac{\text{异品种株（穗）数}}{\text{供检本作物总株（穗）数}}\times 100\%$$

$$\text{异作物比率}=\frac{\text{异作物株（穗）数}}{\text{供检本作物总株（穗）数}+\text{异作物株（穗）数}}\times 100\%$$

$$\text{杂草比率}=\frac{\text{杂草株（穗）数}}{\text{供检本作物株（穗）数}+\text{杂草株（穗）数}}\times 100\%$$

$$\text{病虫害感染率}=\frac{\text{感染病虫株（穗）数}}{\text{供检本作物总株（穗）数}}\times 100\%$$

$$\text{母本散粉株比率}=\frac{\text{母本散粉株数}}{\text{供检母本总株数}}\times 100\%$$

$$父\ (母)本散粉杂株比率 = \frac{父\ (母)本散粉杂株数}{供检父\ (母)本株数} \times 100\%$$

四、作业思考题

1. 简述田间检验程序并填写表 9－6或表 9－7。
2. 如何通过植物品种田间检验对种子品质进行监控？

(高荣岐)

实验 65　种子净度和其他植物种子数目的测定

净度测定的目的是通过对样品的分析，推断种子批的组成情况，为种子清选和质量分级提供依据；同时分离出的净种子为检验其他项目提供样品。

实验目的是通过实验，学会种子净度和其他植物种子数目的测定方法，掌握种子净度分析标准和结果计算与处理。

一、试材及用具

1. 试材

农作物或蔬菜种子送验样品各 1份，小麦≥1 000 g大葱≥50 g玉米≥1 000 g白菜≥100 g。

2. 用具

净度检验台、分样器、分样板、套筛、镊子、刮板、平底勺、样品盘、毛刷、碟子、电动筛选器、放大镜或大视场仪及天平 (感量 1 g感量 0.01 g和 0.001 g)等。

二、依据

种子净度测定是根据标准将样品中的净种子、其他植物种子和杂质区分开，并计算各成分的含量，依此确定种子的种用价值。我国目前采用的净度测定 (快速法)标准规定，完整的种粒和大于原来大小一半的破损种粒均可视为净种子。具体到作物，小麦净种子为颖果和大于原来大小一半的破损颖果，葱净种子为完整的有种皮或无种皮的种子和超过原来大小一半有或无种皮的种子。

关于种子净度测定标准，国际上有精确法和快速法两种。我国过去采用精确法为国家标准，目前以快速法作为国家标准。本实验中涉及到的核对容许差距的方法及未涉及的不同作物种子送验样品重量、试验样品重量、净种子标准等内容参见 GB /T3543.3—1995。

三、方法步骤

Ⅰ　种子净度分析

(一) 称取送验样品

用一定感量的天平称取规定重量的送验样品，小麦 1 000 g,大葱 50 g(M)。

（二）检查重型混杂物

过筛或手拣挑出送验样品中的重型混杂物，称重（m）后将其分为大型其他植物种子（m_1）和重型杂质（m_2），并称重。

（三）分取试验样品

先将样品混匀，用分样器或分样板从送验样品中独立分取两份试样或两份半试样，若经过 1 次分样达不到试样规定重量，可经过 2次或多次分样，以达到或接近试样规定最低重量。试样分取后应根据其规定重量确定用哪种感量的天平称重，规定试样重量越小，所用天平的精密度越高，例如小麦种子试样为 120 g 可用感量是 1/100的天平，葱种子试样为 5 g 可用感量是 1/1 000天平。

（四）试样的筛理与分析

试样分出称重后应经过筛理，以加快试样分析的速度。选用适当筛孔的两层筛子，要求大孔筛筛孔略大于所分析的种子，小孔筛筛孔稍小于所分析的种子。筛理时先将小孔筛放在底盘上，把大孔筛套在小孔筛上，倒入（半）试样，加盖后在筛选器上筛理 2 min，筛后不要急于打开筛盖，以免尘土飞扬。

试样筛理后，将留在各层的筛上物分别倒入样品盘内，根据标准挑拣出杂质和其他植物种子分别放入小碟，净种子放入一容器。以同样的方法筛理分析第二份（半）试样。

（五）各种成分称重

将每份试样的净种子、其他植物种子、杂质分别称重。

（六）结果计算与处理

1. 检查各成分的重量和与样品原重之差是否超过试样原重的 5%。

2. 计算净种子的百分率（P_1），其他植物种子的百分率（OS_1）及杂质的百分率（I_1）

$$P_1 = \frac{\text{净种子重量}}{\text{各成分重量之和}} \times 100\%$$

$$OS_1 = \frac{\text{其他植物种子重量}}{\text{各成分重量之和}} \times 100\%$$

$$I_1 = \frac{\text{杂质重量}}{\text{各成分重量之和}} \times 100\%$$

若为全试样，各种成分的百分率计算到一位小数；若为半试样，各成分的百分率应计算到小数点后两位。

以同样的方法处理第二份试样。

3. 核对容许差距。

4. 含重型杂物样品的最后计算：

$$P_2 = P_1 \times \frac{M - m}{M}$$

$$OS_2 = OS_1 \times \frac{M - m}{M} + \frac{m_1}{M} \times 100\%$$

$$I_2 = I_1 \times \frac{M - m}{M} + \frac{m_2}{M} \times 100\%$$

式中 P_2、OS_2、I_2 分别为最后净种子、其他植物种子和杂质的百分率。当分析的为两份（半）试样

时，式中 P_1、OS_1、I_1 为其各自的平均值。

5. 修正百分率，若原结果百分率取两位小数，可经四舍五入保留一位小数，各成分的百分率相加应为 100.0%，如为 100.1%或 99.9%，则在最大成分上减去超过之数或加上不足之数，如果此修正值大于 0.1%，则应检查计算上有无差错。

（七）填写种子净度分析结果记载表（表 9－9）

净度分析的最后结果精确到一位小数，如果某成分的百分率低于 0.05%，则填报微量，如某种成分的含量为零，则填报“0.0”。

表 9－9　种子净度分析结果记载表

送验样品 M＝　　g

重型混杂物 m＝　　g　m_1＝　　g　m_2＝　　g

		净种子	其他植物种子	杂质	合计重量 /g	样品原重 /g	重量差值百分率
第一份（半）试样	重量 /g						
	百分率 /%						
第二份（半）试样	重量 /g						
	百分率 /%						
试样间百分率差值							
平均百分率							
容许差距							

Ⅱ　其他植物种子数目测定

（一）数取试样

按要求取试验样品，小麦 1 000 g 大葱 50 g 将其倒在检验桌上或样品盘内，逐粒进行观察，找出所有其他植物种子或指定种的种子，并计出每个种的种子数。

（二）计算每千克样品中所含的其他植物种子数

$$\text{其他植物种子含量（粒 /kg）}=\frac{\text{其他植物种子粒数}}{\text{试样重量（g）}}\times 1\,000$$

（三）填写其他植物种子数目测定（表 9－10）和净度分析结果报告单（表 9－11）

表 9－10　其他植物种子数目测定记载表

其他植物种子测定	其他植物种子种类和数目							
	名称	粒数	名称	粒数	名称	粒数	名称	粒数
试样重量 /g								
净度（半）试样Ⅰ中								
净度（半）试样Ⅱ中								
剩余部分中								
合计								
其他植物种子含量 /（粒·kg^{-1}）								

表 9－11　净度分析结果报告单

作物名称	样品编号	
净种子百分率 /%	其他植物种子百分率 /%	杂质百分率 /%
其他植物种子的种类及数目：		
杂质的种类：		

四、作业思考题

1. 种子净度分析的必要性表现在哪些方面？

2. 当送验样品含重型杂物时，为什么在分取试样或半试样前要先挑出重型杂物？为什么需将 P_1、OS_1、I_1 换算成 P_2、OS_2、I_2？

3. 简述种子净度分析的步骤并将实验结果填入表 9－9，表 9－10和表 9－11。

（尹燕枰）

实验 66　植物种子含水量测定

种子含水量是影响种子寿命和安全贮藏的重要因素，是种子分级的重要指标之一。因此，在种子收购、调运及贮藏期间都要测定种子水分，以保证种子的安全贮藏和运输。目前常用的植物种子水分测定方法有国家标准法（电烘箱法）和电子仪器法。

本实验的目的在于掌握测定种子水分常用方法的原理、步骤及注意事项。

Ⅰ　标　准　法

一、试材及用具

1. 试材

小麦、大豆和高水分玉米、花生种子。

2. 用具

电烘箱、粉碎机、烘盒（直径为 4.6 cm，高度为 2～2.5 cm）、粗天平、感量 0.001 g天平、干燥器、磨口瓶、牛角匙、毛刷、手套（纱线）、刀片及 8～10 cm直径的烘盒。

二、原理

电烘箱通电后，电热丝放热，箱内温度升高，湿度降低，供试种子样品在高温低湿下，其内部水分受热气化而蒸发，经过一定的时间，样品内的水分全部被蒸发出来。根据样品减轻的量即可计算样品水分含量。

三、方法步骤

（一）低恒温烘干法

即（103±2）℃ 8 h烘干法。该法适用于油料作物种子和含易挥发性物质的种子水分测定。如葱、花生、芸薹属、辣椒属、萝卜、芝麻、大豆、向日葵、茄子、棉属及亚麻。该法在 RH＜70% 室

内进行。

1. 预热

调电烘箱温度至 110～115 ℃进行预热。

2. 烘干烘盒

洗净烘盒,风干或揩干后放入烘箱内隔网上,盒盖套在盒子底部,距温度计水银球 2～2.5 cm,关闭箱门。将箱内温度调至 (103±2)℃烘 0.5～1 h,取出盒子放入干燥器中,冷却至室温,用感量 0.001 g天平称重,记下盒号与盒重,复烘 0.5 h,至恒重。放入干燥器中备用。

3. 制备样品

将密封 (磨口瓶内)的送验样品 (大豆种子)充分混匀,从中取出约 30 g除去大型杂质和石块、铁屑等,用粉碎机粉碎 (粉碎前磨盘内和接样品盒均要清扫干净),立即装入密封的磨口瓶中备用。大豆、菜豆、西瓜、巢菜种子样品细度要求为至少有 50%的磨碎成分通过 4 mm孔径的铜丝筛,禾谷类种子样品细度要求为至少有 50%磨碎成分通过 0.5 mm孔径的铜丝筛而保留在 1.0 mm孔径铜丝筛上的不超过 10%。

4. 称取试样

将磨碎的大豆种子样品在磨口瓶内混匀,取出样品置于预先烘至恒重的烘盒内,用感量 0.001 g天平准确称取 4.500～5.000 g两次重复,分别记下盒号、盒重和样品重。

5. 烘干试样

将盒内样品摊平,盒盖套在盒子底下,打开烘箱门,将盛有样品的烘盒迅速放入烘箱内,样品盒距温度计水银球 2～2.5 cm,关闭箱门,在 5～10 min内将温度调至 103 ℃,开始计时,在 (103±2)℃下烘 8 h。

6. 冷却称重

烘至规定时间,即可打开烘箱,戴好手套,在箱内迅速盖好盒盖,将烘盒取出烘箱,并置干燥器中冷却至室温 (约 20～30 min),用 0.001 g感量的天平称重。

7. 计算水分含量 (保留一位小数)

$$\text{种子水分含量} = \frac{\text{试样烘前重 (g)} - \text{试样烘后重 (g)}}{\text{试样烘前重 (g)}} \times 100\%$$

8. 核对允许差距

两次重复水分测定结果的允许误差为 0.2%,两次重复的差值在允许误差范围内,取两次重复的平均值为测定结果;若两次重复的差值超过 0.2%,则需重做两次重复,用以计算结果。

(二)高温烘干法

即 130～133 ℃ 1 h烘干法。该法适合于测除油料和含有挥发性物质种子以外的所有植物种子水分。如禾谷类、瓜类、甜菜、菠菜、石刁柏、芹菜、豌豆、菜豆、番茄、胡萝卜、烟草、苜蓿、巢菜及草木樨等。此法不受空气相对湿度的限制。

1. 预调烘箱温度 140～145 ℃。

2. 试样为小麦种子。

3. 与低恒温烘干法相同。

4. 与低恒温烘干法相同。

5. 烘干试样:将盛有样品的烘盒处理好后,迅速放入烘箱,待烘箱温度升至 130 ℃时开始计

时，130～133 ℃烘干 1 h。

6. 到时取出样品，冷却，称重，计算水分含量并核对允许差距（同低恒温烘干法）。

（三）高水分种子预先烘干法

1. 称取样品

从水分超过 18%的玉米种子或水分超过 16%的花生种子送验样品中，用感量 0.001 g天平称取（25±0.02）g整粒种子，两次重复。

2. 第一次烘干

将 25 g整粒玉米种子或花生种子放进 8～10 cm直径的烘盒内。玉米种子在（103±2）℃的烘箱内烘 30 min，花生种子 70 ℃烘 1 h。

3. 称重

到达规定时间后取出，室内冷却后称重。

4. 称取样品

将预烘过的两次重复的玉米种子分别磨碎，用感量 0.001 g天平准确称取样品 4.500～5.000 g两次重复，花生种子磨碎或切片后称样。

5. 第二次烘干

用低恒温烘干法或高温烘干法烘干称重（花生只能用低恒温烘干法）。

6. 计算两次烘干后样品的水分含量

种子水分含量 $=S_1+S_2-S_1\times S_2$

式中：$_1$——第一次整粒种子烘后失去的水分，%

S_2——第二次磨碎种子烘后失去的水分，%

若同一样品两次重复测定结果之间的差距不超过 0.2%，其结果可用两次重复的平均数表示，否则重做两次测定。

Ⅱ 电子仪器法

一、试材及用具

1. 试材

小麦、玉米及大豆等种子。

2. 用具

TL－4型电阻式水分测定仪和 PM888型电容式水分测定仪。

二、原理

电子法快速水分测定仪分为电阻式、电容式两大类。两种类型目前都有多种型号，使用方法也不相同，但同一类型的仪器其基本原理是一致的。

1. 电阻式水分测定仪

该仪器是根据种子水分在一定范围内含量越高则电阻越低这一关系设计的。种子样品在线路中作为一个待测电阻，当含水量高时，电流较大，反之，电流较小。但水分含量与电阻或电流之间并非直线关系，所以仪器读数盘是非均匀分割的。当含水量太低时，相当于断路；当含水量太

高时，相当于短路。所以水分含量超过一定范围，仪器就不能测出。

各种作物种子由于化学组成不同，含有相同水分时，电阻不完全一致，所以每种作物在仪器上都有特定的刻度盘。

样品电阻的大小同时还受温度的影响。当水分含量一定时，温度升高则测定值偏大，反之，偏小。一般仪器以 20 ℃为准，高于或低于 20 ℃时都要对读数值进行校正。

2. 电容式水分测定仪

该仪器是根据样品水分与电容之间的关系而设计的。由于仪器的传感器两极板之间距离为常数，作物种子量一定时，电容量 (C)的变化实际上是由介电常数 (ε)的变化引起的。样品水分含量不同，ε发生变化，从而引起 C的变化，因此，通过测定传感器的电容量，就可间接测定样品的水分。电容式水分测定仪一般都具有温度补偿装置，所以测定值不必校正。

三、方法步骤

(一) 电阻式水分测定仪 (TL－4型)

1. 仪器调整

连接好卡钳与仪器，钳口不要与任何物体接触，将选择开关拨至欲测粮种位置，调节转换开关，调至“校正”，旋转校正旋钮，使指针指满度。调节转换开关调至“满度”，旋转满度旋钮，使指针指满度。调节转换开关调至“测量”，旋转零点旋钮，使指针指零点。再重复一次上述操作过程，以保证测量精度。

2. 测量

取混合均匀的小麦种子一平盘，将钳柄卡紧，在表盘上读出指针所示数值，重复测定两次。

3. 校正

实际水分含量 =读数值 +0. 1×(20－实际温度)

4. 核对误差

TL－4型水分测定仪两次重复最大允许误差为 0. 5%，如符合允许误差，则取两次测定结果的平均值为该样品水分含量。

5. 电阻式水分测定仪在使用时的注意事项

(1) 长期搁置不用的仪器，在使用前应对照标准法进行标定。

(2) 样品水分不得过高、过低，外表不得黏附水分。

(3) 测定时所用样品不得过多或过少，以一平盘为准。

(二) 电容式水分测定仪 (PM 888型)

1. 测量植物种子种类与水分范围

该仪器能够测小麦、玉米、大麦、大豆、绿豆、谷子、高粱、油菜籽、红小豆、花生仁、精米和稻谷 12种作物种子的水分，测量范围较大，多数作物种子含水量在 6% ～30%，小麦、玉米和大麦为 6. 0% ～40%，花生仁为 4. 0% ～15. 0%，精米为 9. 0% ～20. 0%，稻谷为 8. 0% ～35. 0%。水分在 20%以内测量准确度为 ±0. 5%。该仪器能自动测量试样重量，若三分钟不进行操作，电源自动切断。

2. 使用操作如下

(1) 按开关键接通电源。

(2) 按选择键，每按一次，品种编号将增长一个数字，品种编号 12以后是 1，品种编号在电

源切断后将自动被贮存，再次接通电源时，将显示前次电源切断时的品种编号。

⑶ 将料斗套在样品杯上，装入样品，装满后，水平移动料斗，多余样品被刮掉，使样品正好一杯。

⑷ 按测量键，小数点间隔闪亮（请注意：由于在此期间电子天平在调整零点，不要触摸或振动仪器）。“Pour”间隔闪亮后，开始倒入样品。瞄准测量部的中心在 5～6 s内迅速将样品连续倒入，若中途停止，电子天平将认为投入已结束，而立刻计重，如再倒入样品，仪器将不能进行正确测定。

“Pour”消失，小数点闪亮 4次后，显示水分值与测量次数。若水分超出测量范围，高时显示“FFF”，低时显示“AAA”。

⑸ 倒掉样品，此时水分值的显示不变，继续测量时，从步骤（3）将样品装入样品杯开始，重新进行。

⑹ 按平均键，仪器将显示平均值与测量次数。按平均键后，再测定水分时，测量次数将从1开始计算。

⑺ 测定完毕，关闭电源。

3. 使用注意事项

⑴ 由于仪器内部装有电子天平，仪器应放置在无风无震动的水平面上使用。

⑵ 该仪器在 －5 ℃以下或 50 ℃以上无法使用，请升温或降温后再测定。

⑶ 样品温度与仪器温度应一致。

四、作业思考题

1. 种子水分测定的必要性如何？
2. 使用某种种子水分测定方法时应注意哪些事项才能得到准确的测定结果？
3. 简述低恒温烘干法测定种子水分的步骤，计算样品含水量。

（尹燕枰）

实验 67　植物种子发芽试验

种子发芽力的高低是决定种子品质的重要指标之一。在种子收购调运前、贮藏期间以及销售和播前，必须进行发芽试验。因此，发芽试验在种子经营管理过程中作为一项重要的种子品质监控技术而被采用，对种子经营、贮藏和利用的安全性乃至农业生产具有重要作用。为获得种子发芽势和发芽率的正确结果，必须掌握标准发芽试验方法，严格操作。另外，为适应种子工作中多种特殊情况的需要，也必须掌握几种常用的其他快速发芽试验方法。

Ⅰ　标准发芽试验

一、试材及用具

1. 试材

小麦、玉米、棉花、西瓜及白菜等种子。

2. 用具

烧杯、镊子、滤纸、砂子、洗耳球、滴瓶、标签纸、胶水、发芽箱（有光照）、发芽盒及土壤筛（0.05 mm，0.8 mm孔径各一层）等。

二、依据

水分、温度和空气是种子萌发的必需条件，对某些作物的种子来说还需要光照或黑暗。不同的作物由于长期系统发育的影响作用，其种子形成了各自的萌发特性，即萌发所需要的外界环境条件各不相同。据此，在进行种子发芽试验时，必须根据作物种类、种粒大小、种子的化学成分以及发芽床的保水供水性能等，选择适宜的发芽床，控制与供试种子相适应的发芽条件，以获得能代表种子品质状况的发芽试验结果。

三、方法步骤

（一）准备

1. 准备用具

将发芽箱、发芽盒和镊子等用具擦拭干净后备用。

2. 制备发芽床

⑴ 纸床

取比发芽盒底面略小的四层滤纸置于发芽盒内，铺平，加水至饱和。

⑵ 砂床

取建筑用砂，用 0.05 mm和 0.8 mm孔径的土壤筛过筛，将 0.05～0.8 mm粒径的砂清水冲洗后放入搪瓷盘内，置 120～140 ℃的烘箱内烘 3～4 h，取出冷凉后，加水拌匀（砂的含水量为其饱和含水量的 60% ～80%，用手压砂以不出现水膜为宜），将湿砂放于发芽盒内，摊平，砂子厚度为 3 cm左右。

（二）数取试样

从净度测定后的净种子中随机数取玉米、棉花、西瓜种子各 50粒，8次重复，小麦、白菜各100粒，4次重复。

（三）置床

将小麦、白菜种子分别置于纸床上，每盒 100粒，粒与粒之间均匀间隔一定的距离，小麦种胚应朝上，置床完毕加盖。玉米、西瓜和棉花种子分别置于砂床上，每盒 50粒，保持粒距，玉米种胚应朝上，用手指轻压种子使之与砂面平，其上盖 1 cm左右厚的湿砂，加盖，以保持湿度。

（四）贴标签

在标签上注明样品号码、品种名称、产地、重复次数、置床日期等，并将其贴于发芽盒底盘的侧面。

（五）入箱培养

将玉米、西瓜、棉花放于 25 ℃的发芽箱中，小麦、白菜放入 20 ℃的发芽箱中进行发芽。

（六）检查管理

在种子发芽试验期间需每天检查发芽箱内的温度和发芽床的水分。温度要求保持在规定温度 ±1 ℃之间，可用滴管补给发芽床适量一致的水分，同时观察种子有无霉烂，当霉烂种子超过

5%时，应更换发芽床，但腐烂种子一定要除去并记载。

（七）观察记载

在发芽试验过程中，在计算发芽势和发芽率的规定日期各观察记载一次。

初次计数时可将符合发芽标准的正常幼苗（完整幼苗、有轻微缺陷的幼苗和次生感染的幼苗）计数。末次计数时应将正常幼苗、不正常幼苗、新鲜不发芽种子、死种子、硬实，分别计数，初、末次计数的时间玉米为 4 d和 7 d，小麦为 4 d和 8 d，白菜为 5 d和 7 d，棉花 4 d和 12 d，西瓜 5 d和 14 d，填写发芽试验结果记载表（表 9－12）

（八）结果计算与处理

$$\text{种子发芽势}=\frac{\text{发芽试验初期（规定日期内）正常幼苗数}}{\text{供试种子粒数}}\times 100\%$$

$$\text{种子发芽率}=\frac{\text{发芽试验终期（规定日期内）正常幼苗数}}{\text{供试种子粒数}}\times 100\%$$

核对容许差距：当试验结果未超过容许差距（参见 GB/T3543.4—1995）时，可填报发芽试验结果，否则，应重新做试验。

表 9－12　种子发芽试验记载表　　编号：

品种名称			发芽床	
发芽温度			置床日期	年　月　日

记载日期	记载天数	重复																			
		Ⅰ					Ⅱ					Ⅲ					Ⅳ				
		正	硬	新	不	死	正	硬	新	不	死	正	硬	新	不	死	正	硬	新	不	死
合　计																					

试验结果：正常幼苗　　%　　附加说明：

硬实种子　　%

新鲜未发芽种子　　%

不正常幼苗　　%

死种子　　%

合　计：

试验人：

Ⅱ　快速发芽试验

一、试材及用具

1. 试材

小麦、玉米、大豆、棉花、花生、籼稻及粳稻种子。

2. 用具

发芽箱、发芽盒、烧杯、镊子、刀片、玻璃棒、垫板、标签、纱布及 0.05～0.8 mm粒径的烘干消毒砂子等。

3. 试剂

浓硫酸。

二、原理

快速发芽试验是在短于标准发芽试验的时间内正确测定种子发芽力的方法。其基本原理是,利用适当的高温和高湿条件或除去阻碍种子萌发的皮壳和部分果种皮,改善种子的通透性,从而加速种子吸水和内部生理生化反应的进行,促进种子萌发。种子不同,采取的方法各异。

三、方法步骤

(一)禾谷类、豆类高温盖砂法

1. 从净度测定后的净种子中随机数取试样 2份,每份 100粒,于 30 ℃的温水中浸种。水稻 24 h,玉米 3～6 h,麦类、豆类、花生均需 4 h。

2. 取消毒过的砂,加适量水拌匀后放入发芽盒内,铺平 (同标准法),砂厚约 2～3 cm。

3. 将水浸过的种子整齐地排在砂床上,并保持一定距离,玉米、小麦等种胚应朝上。轻压种子使之与砂面平,其上盖一层湿纱布,再盖一层湿砂,稍加镇压。

4. 粘贴标签 (同标准法)。

5. 放于适当的高温处发芽,具体温度因作物而异。例如:粳稻 32 ℃,籼稻、玉米 30～35 ℃,麦类、豆类 25～28 ℃。经 48 h (粳稻 76 h),取出,提起纱布和砂,检查计算发芽率。

(二)切除玉米果柄并撕去胚部种皮法

1. 取玉米净种子 200粒 (分为 2份)30 ℃水浸 3～4 h,到时取出玉米子粒,胚朝下放于垫板上,用刀片切去玉米果柄,并撕去胚部种皮;也可用镊子镊去果柄,同时撕去胚部种皮。

2. 将种子置于湿润的砂床上 (同标准法)或毛巾上 (同毛巾卷法),放入 30 ℃的发芽箱内,2昼夜后,即可检查计算发芽率。

(三)水稻去颖法

1. 取水稻种子 100粒,重复 4次,用出糙机除去颖壳,放于 30 ℃水中浸 3～4 h。

2. 到时取出米粒,置湿润的砂床上 (同标准法)或毛巾上 (同毛巾卷法),放入 30 ℃的发芽箱中发芽。

3. 检查发霉种子,取出洗涤后放回原处,腐烂种子应除去。

4. 籼稻经 2昼夜、粳稻经 3昼夜后检查计算发芽率。

(四)棉花硫酸脱绒切割法

1. 制备发芽床 (同豆类、禾谷类高温盖砂法)。

2. 从净度测定后的净种子中数取试样 2份,每份 100粒,置于烧杯中,加入适量浓硫酸,立即用玻璃棒搅拌,待棉籽上的短绒脱去后,迅速用流水冲洗多次至无酸性为止。

3. 将脱绒后的棉籽置于垫板上,在内脐附近斜切一小口,约为种长的 1/4。

4. 将种子切口向下,平摆在砂床上,其上盖一层湿纱布,再盖一层湿砂。

5. 粘贴标签 (同标准法)。

6. 放入 35 ℃的发芽箱内发芽，48 h后检查计算发芽率。

Ⅲ　其他发芽试验

一、试材及用具

1. 试材

玉米、白菜及小麦种子。

2. 用具

发芽箱、水浴箱、搪瓷盘、毛巾、筷子、电炉、铝锅、镊子、橡皮筋、纸牌、纱布、滤纸及木箱或浅钵等。

二、方法步骤

（一）毛巾卷发芽试验

1. 取毛巾两块，筷子两根，于沸水中煮沸消毒 20～30 min，取出毛巾，沥去多余的水分，平铺在干净的桌面上，中间放一根筷子。

2. 从净度测定后的净种子中随机取玉米种子 2份，各 100粒，分别排在半块毛巾上，毛巾边缘空 2～3 cm，种子间要留一定距离，种胚向上。

3. 种子排好后，将另半块毛巾折过来，覆盖在排列好的种子上，以筷子为轴心，将毛巾卷成柱状，两头用橡皮筋缚住，挂上标签。

4. 入箱发芽，方法步骤如下：

⑴ 将毛巾卷倾斜放入有水的搪瓷盘中，让其自动吸水，挂标签的一头搁在盘缘上。放入 30 ℃的发芽箱中发芽。

⑵ 也可将毛巾卷直接放在水浴箱（30 ℃）内的支架上进行发芽。

5. 到达规定日期，取出毛巾卷，将其打开，记录发芽种子数，并计算发芽率。

注：此法应注意区别折断幼苗和畸形苗，折断的幼苗应作为正常幼苗计算在发芽率内。

（二）纸卷发芽试验

1. 取长方形滤纸两张，约 20×15 cm，与长度方向平行等距离折出 4条痕，留边 2～3cm，用自来水湿润。

2. 取白菜种子 100粒，均匀排在一张滤纸的折痕处，每排 25粒，4排共 100粒。再将另一张湿润滤纸盖上。

3. 将两层滤纸的上下部各折起 1～2 cm，卷成柱状，用橡皮筋缚住，挂上标签，直立于 1 cm水深的水槽或烧杯内（4次重复）。

4. 放于 20 ℃的条件下发芽。

5. 第五天和第七天打开纸卷分别检查计算发芽势和发芽率。

（三）土壤发芽试验

该法是在标准发芽试验结果不良或有怀疑时采用，种子带有病菌或经药剂拌种后，以土壤发芽试验为宜。其具体做法是：

1. 在室外避风向阳处（夏季于阴凉处），圈定一块疏松土壤；若室外条件不适宜，可将疏松洁

净的土壤过筛后装于浅钵或木箱内，并加水湿润。

2. 取小麦种子 100粒，重复 4次，播入土中，覆土，但不镇压，经常喷水保持湿润。如用木箱或浅钵播种的，可搬动木箱或浅钵于适宜的条件下，阴雨天气放在室内。

3. 幼苗出土后，每天检查记载出苗种子数，到达规定日期（小麦 8 d）后，扒开土壤，检查发芽但未出土的种子数，加上已出土的种子数，计算种子发芽率。

三、作业思考题

1. 发芽试验的必要性表现在哪些方面？

2. 简述标准发芽试验的步骤及注意事项，将发芽试验结果填入表 9－13，据此对种子品质做出评定。

表 9－13　种子发芽试验结果记载表

种子来源与发芽方法	作物或品种	重复	置床种子数	初期发芽种子数	终期发芽种子数	霉烂种子数	发芽势/%	发芽率/%
备注								

（尹燕枰）

实验 68　植物种子生活力测定

种子生活力是指种子发芽的潜在能力或种胚具有的生命力。一般情况下，可用发芽试验的方法了解种子有无生活力。但对于休眠种子或在短期内急需了解种子生活力时，可采用生物化学法快速测定种子生活力，为正确评定种子品质提供依据。因此，本实验的目的在于掌握 2，3，5－氯化三苯基四氮唑法（简称四唑或 TTC法）测定种子生活力的原理、步骤和鉴定标准。

一、试材及用具

1. 试材

玉米、大豆及白菜等作物种子。

2. 用具

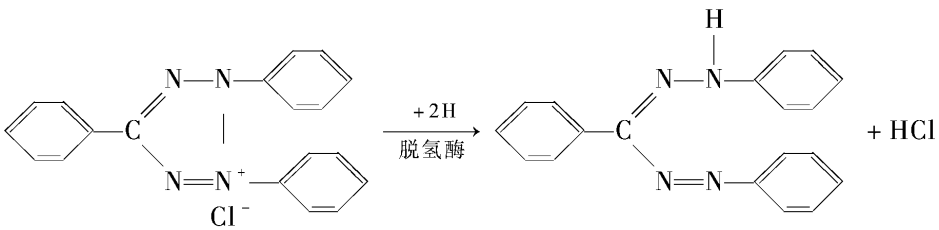
恒温箱、大视场仪或放大镜、镊子、垫板、刀片、解剖针、50 mL、200 mL烧杯及酸度计或精密 pH 试纸等。

3. 试剂

0.1%和 1%的四唑溶液（pH应为 6～7,若 pH不符合试验要求,则可用 pH7.0的磷酸氢二钠 —磷酸二氢钾缓冲液配制）。配制好的 TTC溶液应贮于棕色瓶中,避光保存。若溶液发红时,便不能再用。

二、原理

凡有生活力的种子,其胚部活细胞在呼吸过程中都有氧化还原反应发生,而无生活力的种胚则无此反应。当 TTC溶液渗入种胚活细胞后,参与种胚活细胞的还原作用,并作为氢受体从脱氢酶上接受氢而被还原成红色、稳定、不扩散、不溶于水的三苯基甲腙,使胚部呈现红色;而死种子的种胚或种胚的某一部分无生活力时,则无此反应 (反应式如下),即胚部不呈现红色。据此,可鉴别种子生活力的有无及无生活力种子种胚死组织的部位。



2,3,5-氯化三苯基四氮唑（无色）　　三苯基甲腙（红色）

为加快反应速度,在测定前需对种子进行预处理,包括预湿,暴露种胚等,不同作物种子预湿的时间、方式、暴露种胚的方法各不相同 (参见 GB/T3543.7—1995)。

三、方法步骤

（一）种子预处理

1. 从净度测定后的净种子中随机数取玉米种子、大豆、白菜种子各 100粒,2～4次重复,分别置于 200 mL烧杯中,玉米、白菜用 30 ℃水浸种 3～4 h,大豆在湿纸巾上吸湿一夜,以软化种皮,增强种胚的呼吸强度。

2. 将预浸或预湿过的玉米种子,沿胚中部纵切,取半粒。大豆无需处理,白菜剥去种皮分别置于 50 mL的烧杯中。

（二）反应显色

玉米种子用 0.1% TTC溶液浸泡,大豆、白菜用 1.0% TTC溶液浸泡,均以淹没种子为宜。然后放入 35 ℃的恒温箱中,玉米需 0.5～1 h,大豆 3～4 h,白菜 2～4 h。

（三）观察鉴定

到达规定时间,取出种子用清水冲洗后,用放大镜或大视场仪逐粒观察,根据胚部的显色情况,鉴定种子生活力的有无。观察鉴定的标准是凡胚的主要构造和有关活的营养组织全部染成有光泽的鲜红色,未染部分未超过允许不染色的最大面积,且组织状态正常的为有生活力的种子。允许不染色的最大面积,玉米为盾片上下任一端三分之一不染色,胚根大部分不染色,但不定根的原始体必须染色。大豆为胚根顶端或子叶顶端不染色。白菜为胚根顶端 1/3不染色或子

叶顶端有部分坏死。

（四）结果计算

对被测样品根据其胚部各部分的显色情况，对照标准，将有生活力的种子和无生活力的种子分开，计算有生活力种子的百分率。核对重复间的最大容许差距，若超过容许差距，需重做。

四、作业思考题

1. 在哪些情况下需进行种子生活力测定？

2. 简述四唑法测定种子生活力的原理和步骤，并将实验结果填入表 9－14。注意哪些事项才能准确测定玉米种子的生活力？

（尹燕枰）

表 9－14　种子生活力测定记载表　　编号：

品种		试样粒数		重复	
预处理方法					
试剂名称		试剂浓度			
显色温度		反应时间			
类型 / 重复	有生活力种子	无生活力种子			
Ⅰ					
Ⅱ					
Ⅲ					
Ⅳ					
$\bar{X}$					

试验人：　　测定日期：　　年　　月　　日

实验 69　植物种子室内纯度检验

种子纯度是种子品质分级的主要依据，它直接影响农业生产。因此，测定种子纯度是实现种子品质监控，保证农业生产用种安全的重要手段。种子室内纯度测定方法很多，常用的有子粒形态测定、幼苗形态测定、苯酚测定、过氧化物酶测定和蛋白质电泳测定。此外，随着分子生物技术的发展和应用，PCR、RFLP、AFLP等都可用于品种纯度的鉴定。

本实验的目的在于掌握常用的种子纯度测定方法的依据原理和步骤。

Ⅰ　子粒形态测定法

一、试材及用具

1. 试材

小麦、玉米、大豆、水稻及油菜等作物种子。

2. 用具

放大镜、测种尺及刀片等。

二、依据

由于品种的遗传基础不同,在子粒形态上常常有许多区别,这些形态的差异是进行品种纯度测定的依据。下面介绍几种常见作物子粒形态测定时所依据的性状。

1. 小麦

⑴ 粒色

从白色到红色,有的为紫色或黑色。

⑵ 粒形

有柱形、椭圆形、卵圆形等。

⑶ 胚

胚的大小、形状,胚尖是否突出。

⑷ 腹沟

宽窄、深浅。

⑸ 腹面

圆形、角状。

⑹ 横切面模式

不同品种有较大差异。

⑺ 质地

角质与粉质情况。

⑻ 茸毛

茸毛的多少、长短等。

2. 玉米

⑴ 粒色

白色、红色、黄色、紫色等。

⑵ 粒形

马齿形、硬粒形、半马齿形,在果穗的不同部位粒形也有差异。

⑶ 粒质

粉质部分的大小。

⑷ 顶部

饱满与凹陷情况,粉质的有无及颜色的深浅。

⑸ 胚

胚的大小、形状。

⑹ 棱角

有的棱角明显,有的圆滑。

⑺ 稃色

红、白两类,红色的深浅有差异。

⑻ 花丝遗迹

有的明显，有的不明显。

3. 水稻

⑴ 护颖色

黄、红、红褐、紫。

⑵ 粒形

长宽比、子粒长短。

⑶ 芒

芒色、芒的长短。

⑷ 稃壳

稃壳上斑点多少、大小、颜色。

⑸ 稃毛

多少、长短。

⑹ 米色

白色、红色、紫色。

⑺ 米质

心白大小，透明与否，糯与非糯。

⑻ 米香味

香与不香。

4. 大豆

⑴ 粒色

黄色、绿色、黑色、褐色等各种颜色，每种颜色还有深浅之差。有时几种颜色并存。

⑵ 粒形

圆形、椭圆形等。

⑶ 脐

脐的形状、颜色、长宽比等。

⑷ 脐晕

脐周围颜色有无、深浅、大小。

⑸ 脐条

明显与否，脐条有无颜色、颜色深浅。

⑹ 子叶色

青色、黄色。

⑺ 横切面

形状分圆形和椭圆形，空心的有无，大小。

5. 芸薹属

⑴ 粒色

灰白色到黑色多种。

⑵ 大小形状

有圆形、卵圆形和三角形等，种间有较大的差异。

⑶ 胚

胚根突起明显与否。

⑷ 粒表面

光滑与否，网纹有无、深浅、大小、形状等。

三、方法步骤

1. 从样品中随机取种子 100粒，4次重复。

2. 按照子粒的形态特征逐粒鉴别，将本品种和异品种分开。

3. 结果计算：

$$品种纯度 = \frac{供检种子粒数 - 异品种粒数}{供检种子粒数} \times 100\%$$

Ⅱ　幼苗形态测定法

一、试材及用具

1. 试材

玉米、大豆种子。

2. 用具

同标准发芽试验

二、依据

不同品种在种苗阶段常常存在着差异。这些差异可在室内稳定的条件下得到充分表现从而使不同品种得到区分。在进行幼苗测定时，不能依据单一性状，应对种苗的性状综合鉴定。

1. 禾谷类种子幼苗

⑴ 芽鞘

颜色由绿到紫色，品种之间有差异。

⑵ 种子根

有的品种的中轴及近生根呈浅红色到深红色，有的不带色；根毛的多少长短等。

⑶ 叶

绿色的深浅，叶脉颜色，叶的宽窄，叶上茸毛的多少。

2. 双子叶种子幼苗

⑴ 叶

真叶的形状，边缘的缺刻和皱缩，真叶颜色，子叶的形状（子叶出土型）。

⑵ 胚轴

胚轴的颜色由无色到紫色，胚轴上茸毛的多少及长短。

三、方法步骤

从样品中随机取种子 100粒 ×4，按普通发芽试验要求，在光下发芽，长到一定大小后（一般

7～10 d),综合评价。

幼苗形态测定使用范围是有限的,有些品种根据幼苗形态不易区分。因此,在使用此方法时应先将当地品种的幼苗形态做成标本,找出品种间性状的差异或制作检索表。

可以将子粒形态测定和幼苗形态测定二者结合起来,在子粒形态测定的基础上,将形态一致的子粒进一步进行幼苗形态测定。

Ⅲ　苯酚测定法

一、试材及用具

1. 试材

小麦及水稻种子。

2. 用具

恒温箱、培养皿、100 mL烧杯及滤纸或吸水纸等。

3. 试剂

1. 0%苯酚、0. 3%碳酸钠及 0. 01%硫酸铜。

二、原理

在小麦及水稻种子的果种皮内含有多酚氧化酶及金属元素。苯酚在多酚氧化酶的催化下,被氧化成黑褐色的对苯醌,金属元素在这一反应中起着触媒剂的作用。由于不同品种多酚氧化酶的含量、活性不同,金属元素的多少也有差异,所以在一定条件下被染成的颜色也不同。

小麦子粒颜色可分成 5级:不染色、浅褐色、褐色、深褐色、黑色。

水稻谷粒颜色可分成 5级:不染色、淡茶褐色、茶褐色、黑褐色、黑色。

水稻米粒颜色可分成 3级:不染色、淡茶褐色、褐色。

三、方法步骤

(一) 标准法 (GB /T3543. 5—1995)

1. 小麦

(1) 从样品中随机取种子 100粒 4次重复,置烧杯中加自来水在室温下浸 18～24 h。

(2) 倒去水,将种子均匀地放在铺有 1%苯酚湿润过的滤纸的培养皿中,腹沟朝下,并盖上培养皿盖子。室温下经 4 h观察染色结果,并计算种子纯度 (%)。

2. 水稻

(1) 从样品中随机取种子 100粒 4次重复,置烧杯中加自来水浸 6 h (谷粒或米粒)。

(2) 倒去水,加入 1%苯酚浸泡 12 h。

(3) 取出种子用清水冲洗,放在湿润的吸水纸上经一昼夜,观察染色结果,计算种子纯度 (%)。

(二) 小麦快速法

1. 从样品中随机取种子 100粒 4次重复,用 1%苯酚浸 15 min。

2. 取出放在铺有 1%苯酚湿润过的滤纸的培养皿中,腹沟朝下,并盖上贴有同样滤纸的培养

皿盖。

3. 置 30～40 ℃温箱内，染色 0.5～1 h。观察染色结果，并计算种子纯度（%）。

某些小麦品种利用标准法染色后，颜色相同无法区别。可采用加速或延缓剂处理后，再染色鉴定。对染色很深的种子，利用 0.3% 碳酸钠处理，以延缓反应；对染色很浅的种子，可利用 0.01% 硫酸铜处理，加速反应。具体方法：将种子用相应的试剂浸种 18 h（室温），然后按标准法步骤（2）进行测定。

Ⅳ　过氧化物酶测定法

一、试材及用具

1. 试材

大豆种子。

2. 用具

小打孔器及指形管等。

3. 试剂

0.5% 愈创木酚及 0.1% 过氧化氢。

二、原理

大豆种皮中含有过氧化物酶，可使 H_2O_2 分解放出氧，将愈创木酚氧化成红棕色 4—邻甲氧基酚。不同品种过氧化物酶活性不同，过氧化物酶活性越高，氧化生成的红棕色 4—邻甲氧基酚越多，颜色越深，反之，颜色越浅。可据此区分品种。

三、方法步骤

1. 从样品中随机取大豆种子 100 粒两次重复。逐粒用小打孔器取下两片大豆种皮，放入指形管中，加入 1 mL 蒸馏水，30 ℃浸提 1 h。

2. 每个试管中加入 10 滴 0.5% 愈创木酚，10 min 后加入 1 滴 0.1% 过氧化氢溶液。经 1～5 min 后，根据溶液颜色一致性，区别本品种和异品种，计算种子纯度（%）。

3. 请注意以下事项：

（1）愈创木酚法属酶促反应，因此，所取大豆种皮量各粒应一致。如不用打孔器取样，剥下种皮的破碎程度应一致。

（2）预先对当地品种进行测定，建立标准图谱，依此为对照。

Ⅴ　聚丙烯酰胺凝胶电泳测定法

一、试材及用具

1. 试材

玉米、小麦或大麦种子。

2. 用具

电泳仪（稳压范围 0～600 V，稳流范围 1～100 mA）、离心机（一次离心样品在 12个以上）、离心管（1.5 mL）、离心管架、垂直板夹心式电泳槽、单粒磨、天平（感量 0.1 g 0.001 g）、试剂瓶（100 mL，500 mL，1 000 mL）、移液管（5 mL，10 mL）、微量进样器（0～100 μL）、注射器（5 mL）及油灰刀等。

3. 试剂（要求化学纯以上）

丙烯酰胺、N，N—亚甲基双丙烯酰胺 Bis、尿素、冰醋酸、过硫酸铵、四甲基乙二胺（TEMED）、硫酸亚铁、考马斯亮蓝 R—250、无水乙醇、三氯乙酸、甲基绿、甘氨酸、过氧化氢、抗坏血酸、2—巯基乙醇、2—氯乙醇、乳酸、乳酸钠、氯化钠、蔗糖及正丁醇等。

二、依据

聚丙烯酰胺凝胶电泳一般具有分子筛效应、电荷效应和浓缩效应。蛋白质在这些效应的作用下得到良好的分离，通过显色，就可分析出蛋白质的组成。不同品种由于其遗传组成不同，种子内所含的蛋白质种类有差异。这些差异可利用 PAGE 技术加以鉴别，从而对品种的真实性和纯度进行鉴定。

聚丙烯酰胺凝胶电泳（PAGE）法是一种纯度测定新技术。该法测定结果准确、可靠，但技术条件要求严格。作物种类不同，电泳的对象也不同。目前国际种子检验协会已颁布了小麦、大麦品种纯度测定的醇溶蛋白电泳技术，农业部颁布了“玉米种子纯度盐溶蛋白电泳鉴定方法”标准，山东省技术监督局发布了“玉米自交系及单交种真实性和品种纯度电泳鉴定方法”，其他作物种子的 PAGE 法也有许多报道。

三、方法步骤

（一）大小麦醇溶蛋白电泳

1. 试剂配制

⑴ 蛋白质提取液

① 小麦醇溶蛋白提取液

0.05 g甲基绿，溶于 25 mL 2—氯乙醇中，加蒸馏水至 100 mL。低温保存。

② 大麦醇溶蛋白提取液

0.05 g甲基绿，溶于 20 mL 2—氯乙醇，加入 18 g尿素中，再加入 1 mL 2—巯基乙醇，加蒸馏水至 100 mL。低温保存。

⑵ 电极缓冲液

0.4 g甘氨酸加蒸馏水溶解，加 4 mL冰乙酸，加蒸馏水至 1 000 mL。低温保存。

⑶ 凝胶缓冲液

1.0 g甘氨酸加蒸馏水溶解，加入 20 mL冰乙酸，定容至 1 000 mL。低温保存。

⑷ 0.6%过氧化氢

30% H_2O_2 2 mL加蒸馏水定容至 100 mL。低温保存。

⑸ 染色液

0.25 g考马斯亮蓝加 25 mL无水乙醇溶解，加入 50 g三氯乙酸，加水至 500 mL。

⑹ 凝胶液

丙烯酰胺 20 g N,N—亚甲基双丙烯酰胺 0.8 g 尿素 12 g 硫酸亚铁 0.01 g 抗坏血酸 0.2 g 用凝胶缓冲液溶解并定容至 200 mL。低温保存。

2. 样品提取

取小麦或大麦种子 100粒 (分为两组),用单粒磨逐粒磨碎,置 1.5 mL离心管中,加入提取液 (小麦 0.2 mL、大麦 0.3 mL),充分摇动混合,在室温下提取 24 h以上。然后在 18 000 g条件下,离心 15 min,上清液用于电泳。

3. 凝胶的制备

⑴ 将橡胶框和玻璃板装好,固定在电泳槽上。从冰箱中取出凝胶溶液和过氧化氢溶液,吸取 10 mL凝胶溶液,加 1滴 0.6%过氧化氢,迅速摇匀,倒入封口,5～10 min聚合封好。

⑵ 吸取 45 mL凝胶溶液,加 3滴 0.6%过氧化氢,迅速摇匀,倒入凝胶板之间,马上插上样品梳,让其在 5～10 min内聚合。

4. 点样

小心地抽出样品梳。用注射器吸去样品槽中的水分。用微量进样器吸取 20 μL样品加入样品槽中。

5. 电泳

将上下槽注入电极液,上槽接正极,下槽接负极。然后打开电源,逐渐增加到 500 V,电泳甲基绿移至前沿所需时间的 2～2.5倍,一般 60～80 min。

6. 染色

将胶板取下在染色液中染色 1～2 d,后用清水冲洗,鉴定种子真实性和品种纯度 (根据醇溶蛋白谱带的组成及带型的一致性,区分本品种和异品种)。

(二) 玉米种子贮藏蛋白电泳

1. 试剂配制

⑴ 蛋白质提取液

12 mL冰醋酸,18 g尿素,加蒸馏水溶解,再加 4 mL TEMED和 0.05 g甲基绿加蒸馏水至 100 mL,摇匀,低温保存。

⑵ 凝胶溶液

10 g丙烯酰胺,10 g尿素,0.2 g Bis加蒸馏水溶解,加 3 mL冰醋酸,0.020 g硫酸亚铁,加蒸馏水至 100 mL,摇匀,低温保存。

⑶ 催化剂溶液

3.5%过硫酸铵溶液,用前现配。

⑷ 电极液

1.5%冰醋酸溶液配 1 000 mL。

⑸ 染色液

0.4 g考马斯亮蓝加 25 mL无水乙醇溶解,加 50% ～60%三氯乙酸,加蒸馏水至 500 mL。

2. 样品提取

一般每样品测定设两重复,每重复 100粒,共 200粒种子,如果测定真实性可用 100粒。每粒种子用单粒磨粉碎,置 1.5 mL离心管内,按样品体积的 1∶1.5～1∶2加入提取液充分混匀提取

20～30 min。然后在 4 000 r/min条件下离心 3～4 min,取上清液备用。

3. 凝胶制备

将橡胶框和玻璃板装好,然后固定在夹心式电冰槽上。取 10 mL左右凝胶溶液加一滴催化剂溶液,摇匀迅速倒入电泳槽底部,5 min左右聚合封好底。

取 30 mL左右凝胶溶液加 2滴催化剂溶液,摇匀,迅速倒入玻璃板之间,并插入样品梳,让其在 2～3 min聚合。

4. 点样

小心抽出样品梳,用注射器吸去样品槽中的水分,用微量进液器吸取 30～40 μL样品加入样品槽中。

5. 电泳

将电泳槽注入电极液,靠近短玻板处 (点样品)接正极,长玻板处接负极。打开电源逐渐增加到 85 mA左右,稳流电泳 80～90 min至甲基绿移出胶板下端。

6. 染色

将胶板用油灰刀取下,置染色液中染色 12 h左右。一般不需脱色,冲洗观察。

7. 鉴定

根据蛋白谱带类型,鉴定玉米自交系及单交种的真实性并计算其纯度。

8. 注意事项:

(1) 子粒的大小对测定无影响,产地只要亲本遗传基础一致,蛋白质电泳谱带就一样,对带型没有影响,象鼻虫等危害后,只要胚存在对纯度无影响,正、反交带型完全一样,萌芽后种子的蛋白质谱带开始模糊,但带型仍基本一致。

(2) 单交种 F_1 代的带型表现为双亲共显性,可用双亲提取液的混合液制备 F_1 代种子的标准谱带。如熟悉待测品种的带型和互补带的位置,测定时不需加对照,否则,加标准样品作对照。

(三) 玉米种子盐溶蛋白电泳

1. 配制试剂

(1) 电极缓冲液

称甘氨酸 6.00 g倒入 2 000 mL烧杯中,加入 1 800 mL去离子水溶解,用 2.0 mL乳酸调至 pH3.3,再加去离子水定容至 2 000 mL,混匀。

(2) 样品提取液

称取氯化钠 5.80 g蔗糖 200.00 g甲基绿 0.15 g倒入 1 000 mL烧杯中,加去离子水 800 mL溶解,加热至微沸,放至室温,用去离子水定容至 1 000 mL。在 4℃下保存。

(3) 分离胶缓冲液

取 1.43 mL乳酸钠于 1 000 mL烧杯中,加去离子水 980 mL,用乳酸调至 pH3.0,再加去离子水定容至 1 000 mL,贮于棕色瓶中,在 4℃下保存。

(4) 分离胶溶液

称取丙烯酰胺 112.50 g N,N′—亚甲基双丙烯酰胺 3.75 g抗坏血酸 0.25 g硫酸亚铁 8.0 mg用分离胶缓冲液溶解后定容至 1 000 mL,过滤于棕色瓶中,在 4℃下保存 (不超过 14 d)。

(5) 浓缩胶缓冲液

取 0.30 mL乳酸钠于 200 mL烧杯中,加去离子水 90 mL,用乳酸调至 pH5.2,再加去离子水

定容至 100 mL,贮于棕色瓶中,在 4 ℃下保存。

⑹ 浓缩胶溶液

称取丙烯酰胺 6.00 g N,N′—亚甲基双丙烯酰胺 1.00 g 抗坏血酸 0.03 g 硫酸亚铁 0.8 mg 用浓缩胶缓冲液溶解后定容至 100 mL,过滤于棕色瓶中,在 4 ℃下保存(不超过 6 d)。

⑺ 3%的过氧化氢溶液

取 30%的过氧化氢 1 mL,加 9 mL去离子水,贮于棕色瓶中,在 4 ℃下保存。

⑻ 染色液

称取考马斯亮蓝 R—250 2.00 g 在研钵中用 100 mL无水乙醇研磨溶解,过滤于棕色瓶中。取 10 mL,加入到 200 mL的 10% (m/V)三氯乙酸溶液中,混匀。

2. 电泳操作

⑴ 样品制备

随机取玉米种子至少 100粒,用单粒粉碎器粉碎,放入 1.5 mL离心管中,用滴管加入与样品体积相同的样品提取液,摇匀,放置 5 min后,再摇一次,30 min后,用离心机离心 (5 000 r/min) 15 min,取上清液用于电泳。

⑵ 凝胶制备

① 装板与封底

将预先洗净晾干的玻璃板装入胶条中,然后把胶条固定在垂直板电泳槽内,保持水平,短板向正极,拧紧螺栓。取适量分离胶溶液于烧杯中,用微量进样器加入适量 3%的过氧化氢溶液(一般每 5 mL分离胶溶液加 20 μL 3%过氧化氢溶液),迅速摇匀,并从长玻璃板外侧沿玻璃板倒入,振动电泳槽 3次,放平。

② 灌分离胶

底缝封住后,用滤纸条插入两玻璃板之间,吸去因聚合而析出的水,量取分离胶溶液适量,加入 3%过氧化氢溶液 (一般每 15 mL分离胶溶液加 3%过氧化氢 20 μL) 迅速摇匀,倾斜电泳槽,将分离胶溶液倒入两玻璃板之间,高度距短玻璃板上沿 1.2 cm,放平电泳槽并在实验台上振动 3次后,迅速加入适量的正丁醇封住胶面。待凝胶聚合后,吸出分离胶表面上的正丁醇,并用去离子水冲洗胶面 3次,用滤纸吸干。

③ 灌浓缩胶

量取浓缩胶溶液适量,加入 3%过氧化氢溶液 (一般每 15 mL分离胶溶液加 3%过氧化氢 40 μL),迅速搅匀,倒入两玻璃板之间,马上插好样品梳,样品梳底部距分离胶顶部 0.5 cm。

⑶ 点样

浓缩胶聚合后,拔出样品梳并将样品槽清理干净,用微量进样器在每个样品槽中加入不同子粒的样品上清液 15 μL,每点一粒后,都要用去离子水清洗进样器 3次。

⑷ 电泳

加样完毕后,倒入电极缓冲液,上槽电极缓冲液面要高于短玻璃板,下槽电极缓冲液面要高于铂金丝,将电源线正极接上槽,负极接下槽。接通电源,采用 500 V稳压进行电泳,待甲基绿指示剂下移至胶底部边缘时,关闭电源。

⑸ 卸板

倒出电极液,从电泳槽内取出玻板,卸下胶条,启开玻璃板,取出胶片,浸入染色液中。

⑹ 染色、洗板、鉴定

在 30 ℃恒温条件下染色 2～4 h。取出胶片，用 0.5%的不加酶洗衣粉水洗净。鉴定胶片上电泳谱带的特征和一致性，计数供检样品粒数和非本品种粒数，并按下式计算本品种种子纯度。

$$\text{本品种种子纯度} = \frac{\text{供检样品粒数} - \text{非本品种粒数}}{\text{供检样品粒数}} \times 100\%$$

四、作业思考题

1. 常用的植物种子纯度测定方法有哪些？
2. 每种测定方法所依据的原理是什么？在具体操作中应注意哪些事项？

（尹燕枰）

参 考 文 献

[1] 曹孜义. 实用植物组织培养教程. 兰州:甘肃科学技术出版社, 1996
[2] 董洪平. 作物遗传育种实验技术与方法. 北京:中国农业出版社, 1999
[3] 董树亭. 植物生产学. 北京:高等教育出版社, 2003
[4] 杜克生. 食品生物化学. 北京:化学工业出版社, 2002
[5] 高灿伦等.作物种子实验技术. 郑州:河南科学技术出版社, 1992
[6] 顾红雅等. 植物基因与分子操作. 北京:北京大学出版社, 1995
[7] 郭尧君. 蛋白质电泳实验技术. 北京:科学出版社, 1999
[8] 何照范. 粮油子粒品质及其分析技术. 北京:农业出版社, 1985
[9] 胡能书等. 同工酶技术及其应用. 长沙:湖南科学技术出版社, 1985
[10] 胡延吉. 植物育种学. 北京:高等教育出版社, 2003
[11] 黄意欢.茶学实验技术. 北京:中国农业出版社, 1997
[12] 金冬雁等. 分子克隆实验指南.第 3版. 北京:科学出版社, 2003
[13] 李向辉. 植物遗传操作. 北京:高等教育出版社, 1994
[14] 林加涵等. 现代生物学实验 (上、下). 北京:高等教育出版社, 2000
[15] 刘进元等. 分子生物学实验指导. 北京:清华大学出版社, 2002
[16] 刘邻谓. 食品化学. 北京:中国农业出版社, 2000
[17] 刘铭三. 谷物及油料品质分析法. 北京:农业出版社, 1987
[18] 牛森. 作物品质分析. 北京:农业出版社, 1992
[19] 全国棉花质量检验员执业资格考试专家委员会. 棉花质量检验. 北京:中国计量出版社, 2001
[20] 申宗坦. 作物育种学实验. 北京:农业出版社, 1995
[21] 沈德绪. 果树育种实验技术. 北京:农业出版社, 1994
[22] 宋思杨. 生物技术概论.第 2版. 北京:科学出版社, 2003
[23] 孙崇荣等. 蛋白质化学导论. 上海:复旦大学出版社, 1991
[24] 孙敬三等. 植物细胞工程实验技术. 北京:科学出版社, 1995
[25] 王关林等. 植物基因工程原理与技术. 北京:科学出版社, 1998
[26] 王晶英等. 植物生理生化实验技术与原理. 哈尔滨:东北林业大学出版社, 2003
[27] 王肇慈. 粮油食品品质分析. 北京:中国轻工业出版社, 2001
[28] 魏君年. 分子生物学实验指导. 北京:高等教育出版社, 1999

[29] 文树基. 基础生物化学实验指导. 陕西:陕西科学技术出版社, 1994
[30] 谢学民等.核技术农学应用. 上海:上海科学技术出版社, 1989
[31] 杨汉民. 细胞生物学实验. 北京:高等教育出版社, 2000
[32] 杨建雄. 生物化学与分子生物学实验技术教程. 北京:科学出版社, 2002
[33] 杨增海. 园艺植物组织培养. 北京:农业出版社, 1987
[34] 张成良等. 植物病毒鉴定. 北京:农业出版社, 1980
[35] 张治安等. 植物生理学实验指导. 北京:中国农业科学技术出版社, 2004
[36] 赵世杰等. 植物生理学实验指导. 北京:中国农业科技出版社, 1998
[37] 中国科学院上海植物生理研究所. 现代植物生理学实验指南. 北京:科学出版社, 1999
[38] 国家技术监督局. 农作物种子检验规程 (GB/T 3543.1—3543.7—1995). 北京:中国标准出版社, 1995
[39] 中华人民共和国农业部. 玉米种子纯度盐溶蛋白电泳鉴定方法 (NY/T449—2001). 北京:中国标准出版社, 2001
[40] 中山大学,南京大学合编. 植物学. 北京:高等教育出版社, 1985
[41] 周琦. 实验教学是培养学生综合素质和创新能力的重要手段和途径. 实验技术与管理, 2003
[42] 安学丽等. 化学诱变及其在农作物育种上应用. 核农学报, 2003, 17 (3):4～7
[43] 陈德明等. 盐胁迫下不同小麦品种的耐盐性及其离子特征. 土壤学报, 1998, 35 (1):88～94
[44] 陈学森等. 杏及大樱桃花器官冻害调查. 园艺学报, 2001, 28 (4):373
[45] 陈学森等. 果树杂交去雄方法的研究. 山东农业大学学报, 1989, 20 (3):21～26
[46] 陈子元. 从辐射育种的发展来展望航天育种的前景. 核农学报, 2002, 16 (5):261～263
[47] 高屏. 把握时代要求,注重实验教学法研究. 实验技术与管理, 2001, 18 (5):92～94
[48] 黄琼等. 蚕豆品种抗菌性茎疫病鉴定. 云南农业大学学报, 2000, 15 (3):287～288
[49] 姜华武等. 淹水对玉米根系几种酶活性的影响. 湖北农学院学报, 1999, 19 (3):209～211
[50] 李金国. 蔬菜航天诱变育种. 中国蔬菜, 1999 (1):4～5
[51] 李金国等. 中国农作物航空航天诱变育种的进展及其前景. 航天医学与医学工程, 1999, 12 (6):464～467
[52] 刘旭等. 小麦耐盐种质的筛选鉴定和耐盐基因的标记. 植物学报, 2001, 43 (9):948～954
[53] 密士军等. 航天诱变育种研究的新进展. 黑龙江农业科学, 2002 (4):31～33
[54] 牛海山等. 吸湿回干种子处理对小麦萌发期抗盐性的影响. 内蒙古大学学报, 1999, 30 (1):79～84
[55] 沈桂芳. 航天育种——21世纪前景诱人的农业高新技术. 农业科技经济管理, 2001 (3):4～7
[56] 沈洪波等. 果树抗寒性的遗传与育种研究进展. 果树学报, 2002, 19 (5):292～297
[57] 孙什等. 李品种资源对细菌性穿孔病抗性的初步研究. 中国果树, 1999 (2):31～32
[58] 孙文全. 联苯胺比色测定果树过氧化物酶活性的研究. 果树科学, 1988, 5 (3):105～108
[59] 屠萍官等. 生命科学实验教学体系构建与创新人才培养. 实验技术与管理, 2002, 19 (2):

4～7

[60] 吴国胜等. 大白菜热害发生规律及耐热性筛选方法的研究. 华北农学报, 1995, 10 (1): 111～115

[61] 许敖敖. 处理好理论教学与实验教学关系,提高学生素质,培养学生创新能力. 实验技术与管理, 2001, 18 (6): 1～3

[62] 于同泉等. 逆境中植物体内甜菜碱的积累及其生物学意义. 北京农学院学报, 1994, 9 (2): 161～167

[63] 赵延昌等. 番茄品种对番茄细菌性斑点病的抗性鉴定. 植物保护, 2000, 26 (4): 49～50

[64] 赵永亮等. 利用花粉化学诱变快速创造特用玉米种质. 作物学报, 1999, 25 (2): 157～161

[65] 赵玉田. 作物抗寒性鉴定原理与鉴定技术体系的研究. 作物学报, 1993, 19 (5): 420～428

[66] Shaoli Lu, Mark Rieger. Cold acclimation of young kiwifruit vine under artificial hardening conditions [J]. Hortscience, 1990, 25 (12): 1628～1630

[67] S. K. Kang, H. Motosugi, K. Yonemori etc. Supercooling characterics of some deciduous fruit trees as related to water movement within the bud [J]. Journal of Horticultural Science & Biotechnology, 1998, 73 (2): 165～172